NICHTTRANSKRIPTIVE BIOSYNTHESE VON POLYRIBONUKLEOTIDEN IM ZELLKERN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt
dem Fachbereich Chemie
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

MANUEL GREZ
aus Santiago de Chile

Marburg/Lahn 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

NICHTTRANSKRIPTIVE BIOSYNTHESE VON POLYRIBONUKLEOTIDEN IM ZELLKERN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt
dem Fachbereich Chemie
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

MANUEL GREZ
aus Santiago de Chile

Marburg/Lahn 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Von dem Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 14.6.1978

Tag der mündlichen Prüfung am 5.7.1978

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. P. Karlson

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Follmann

Die vorliegende Arbeit wurde am
Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität in Marburg
unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. J. Niessing
angefertigt.
Herrn Prof. Dr. J. Niessing möchte ich
für Unterstützung und anregende Diskussionen
danken.
Ebenfalls danke ich dem Direktor des
Instituts für Physiologische Chemie,
Herrn Prof. Dr. Dr. P. Karlson, für die
Förderung der Arbeit sowie dem Deutschen
Akademischen Austauschdienst für die
finanzielle Unterstützung.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546006_0039

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	9
2.1.	Material	9
2.2.	Methoden	11
2.2.1.	Isolierung der Nukleotid-Polymerasen aus Rattenleberzellkernen	11
2.2.2.	Isolierung der Nukleotid-Polymerasen aus Ehrlich Asciteszellkernen	13
2.2.3.	Bestimmung der Aktivität der Nukleotid-Polymerasen	15
2.2.4.	Präparation des ATP-Sepharose Gels	16
2.2.5.	Gel-Elektrophorese	18
2.2.6.	RNA-Extraktion	19
2.2.7.	"Nearest-Neighbour" Sequenzanalyse	20
2.2.8.	Isolierung der Poly(A)- und Oligo(U)-Sequenzen aus Kern-RNA	22
3.	Ergebnisse	24
3.1.	Weitere Reinigung der Poly(A)-Polymerase aus Rattenleberzellkernen durch Affinitäts-Chromatographie an ATP-Sepharose	24
3.1.1.	SDS-Gel-Elektrophorese der Poly(A)-Polymerase nach ATP-Sepharose Chromatographie und Analyse der Polymerisationsprodukte des Enzyms	29
3.2.	Isolierung der Nukleotid-Polymerasen aus Ehrlich Asciteszellkernen	32

3.2.1.	Charakterisierung der Nukleotid-Polymerasen aus Ehrlich Asciteszellkernen	33
3.2.1.1.	Bestimmung des Molekulargewichts	33
3.2.1.2.	Ionen	35
3.2.1.3.	pH-Optimum	38
3.2.1.4.	Zeitkinetik und Charakterisierung des Produktes der Poly(A)-, Poly(U)- und Poly(C)-Polymerase Reaktion	39
3.2.1.5.	Primer-Spezifität	40
3.2.1.6.	Inhibitoren der Enzym-Reaktion	42
3.2.1.7.	Poly(A)-Abbau durch Poly(A)-Polymerase	46
3.3.	Nichttranskriptive Synthese von Ribonukleotid-Copolymeren durch Nukleotid-Polymerasen aus Kernen von Rattenleberzellen und Ehrlich Asciteszellen	48
3.4.	Untersuchungen der nichttranskriptiven Synthese von Polyribonukleotiden in vivo	57
3.4.1.	Einfluß von Actinomycin D auf die RNA-Synthese in Ehrlich Asciteszellen	57
3.4.2.	Oligo(U)-Sequenzen in Kern-RNA aus Ehrlich Asciteszellen: Transkriptive oder nichttranskriptive Synthese?	62
3.4.3.	Einfluß von 3' Desoxyadenosin bzw. 2' Desoxyadenosin auf die RNA- und Poly(A)-Synthese in vivo	65
4.	Diskussion	72
5.	Zusammenfassung	87
6.	Literaturverzeichnis	91

I. EINLEITUNG

Die hoch spezialisierte Funktion einer Zelle wird durch die selektive Expression ihres Genoms bestimmt. Während des Zellzyklus werden bestimmte Genabschnitte exprimiert und andere stillgelegt, Prozesse, die mit identischem Ablauf von Zellgeneration zu Zellgeneration wiederholt werden. Ein deutliches Beispiel dafür ist die Synthese der Histon-Proteine, die nur während der S-Phase des Zellzyklus (DNA-Replikation) stattfindet (31, 32). Diese selektive Expression der genetischen Information setzt die Existenz von Kontrollen über die Vorgänge voraus, die zu der Expression bestimmter Genabschnitte führen. Die Übertragung der genetischen Information findet in folgenden Schritten statt: 1. Die genetische Information, die im Zellkern in Form einer Desoxyribonukleotidsequenz (DNA) vorhanden ist, wird durch die RNA-Polymerase in eine Ribonukleotidsequenz (mRNA) umgewandelt (Transkription) 2. Die mRNA wird aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert und 3. nach der Bindung der mRNA an Ribosomen wird die genetische Information in die Form einer Aminosäuresequenz (Protein) umgesetzt, deren Sequenz also durch die Basensequenzen des abgelesenen Gens bestimmt ist (Translation).

In Prokaryonten findet die Regulation der Genexpression hauptsächlich durch die Bindung spezifischer Proteine (Repressoren) an den Operator statt (Basensequenz in der DNA, die für die Expression von Strukturgenen verantwortlich ist). In dieser Form verhindern die Repressoren die Wechselwirkung

der DNA-abhängigen RNA-Polymerase mit dem Operator. Durch die Bindung von Stoffwechselprodukten an die Repressoren wird die Blockierung des Operators aufgehoben. Die Wechselwirkung zwischen Operator und RNA-Polymerase führt dann zu der Transkription der Strukturgensequenzen in das mRNA-Molekül (33).

In Eukaryonten ist die Regulation der Vorgänge, die zu der Expression der genetischen Information führen, viel komplexer. Die Existenz mehrerer Formen der RNA-Polymerase (34), die verschiedene Genabschnitte transkribieren, macht eine differenzierte Expression dieses Gens durch die Kontrolle über die Konzentration und/oder die Aktivität der verschiedenen Polymerasen möglich (35). In höheren Organismen wird die genetische Information in die Form eines hnRNA-Moleküls umgewandelt, das nach seiner Synthese im Zellkern zu einem mRNA-Molekül prozessiert wird (36). Die mRNA wird in das Cytoplasma transportiert, wo sie nach Bindung an Ribosomen translatiert wird. Die verschiedenen Faktoren, die an der Translation der mRNA beteiligt sind, ermöglichen eine letzte Kontrolle über die Expression der genetischen Information, die die mRNA trägt (37).

Durch Hybridisierung von mRNA mit DNA ist es möglich, den Anteil des Zellgenoms zu bestimmen, der exprimiert worden ist. Solche Versuche haben gezeigt, daß etwa 2% des eukaryotischen Genoms exprimiert wird. Dennoch betrug der Anteil des Zellgenoms, welcher gegen hnRNA hybridisiert, 15% (38). Bei der Hybridisierung der hnRNA-Population gegen DNA wurden verschiedene Hybridisierungsraten beobachtet: die Se-

quenzen, die mehrmals in dem hnRNA-Molekül vorkommen (repetitive Sequenzen), hybridisieren schneller als die Sequenzen, die nur einmal in der hnRNA vorhanden sind (nicht-repetitive Sequenzen). Aus der Analyse solcher Daten stellte sich heraus, daß verschiedene Typen von Sequenzen in einem hnRNA-Molekül vorhanden sind, die eine Vorstellung über die Komplexität des hnRNA-Molekül vermitteln. Eine ähnliche Analyse der mRNA-Sequenzen ergab eine 4 bis 10fach niedrigere Komplexität ihrer Sequenzen, die hauptsächlich aus nicht-repetitiven Sequenzen bestand (38). Obwohl 15% des Zellgenoms in hnRNA-Moleküle transkribiert wird, enthalten nur 25% der hnRNA-Population mRNA-Sequenzen. Diese Tatsache, neben der höheren Komplexität der hnRNA-Population, erfordert im Zellkern die Selektion der hnRNA-Sequenzen, die in Form von mRNA in das Cytoplasma transportiert werden sollen. Durch die Charakterisierung der Sequenzen, die in hnRNA und mRNA vorhanden sind, ist es möglich, diese Selektions-Prozesse zu untersuchen. Auf diesem Weg sind mehrere gemeinsame Sequenzen identifiziert worden:

1. Am 5' Ende der hnRNA und mRNA liegen die Sequenzen $m^7GpppX^m{}_pY^{(m)}{}_p$ (Cap-Struktur), N^6-methylierte Adenosin-Basen innerhalb der Sequenzen $-N_1-(G/A)m^6A-C-N_2$ (39) und Oligo(U) Sequenzen (23).

2. Am 3' Ende der hnRNA und mRNA liegt eine Poly(A) Sequenz, die etwa 200 Nukleotide lang ist (11, 40, 41).

Die Methylierung der Adenosin-Basen und die Synthese der Cap-Strukturen am 5' Ende und der Poly(A) Sequenzen am

3' Ende des hnRNA-Moleküls sind Prozesse, die nach der Transkription stattfinden und die zusammen mit der Abspaltung der repetitiven Sequenzen aus der hnRNA möglicherweise zu einer posttranskriptionellen Kontrolle der Genexpression führen, d.h. die Selektion der mRNA-Sequenzen, die in das Cytoplasma transportiert werden.

Nach der Entdeckung der Poly(A)-Sequenzen in der hnRNA und mRNA schien zunächst die Polyadenylierung der hnRNA das entscheidende Ereignis während der Prozessierung der hnRNA zu sein, da in Zellen, die mit Cordycepin (Inhibitor der Poly(A)-Synthese) behandelt worden waren, keine mRNA in Polysomen nachgewiesen werden konnte, obwohl die hnRNA-Synthese kaum von Cordycepin beeinflußt worden war (11, 26, 42). Dies deutete eine Selektion der mRNA-Sequenzen durch die Polyadenylierung der hnRNA an und eine vollständige Prozessierung der polyadenylierten hnRNA-Population zu mRNA. Dennoch zeigten Untersuchungen über die Einbaukinetik von AMP in Kern- und cytoplasmatische Poly(A), daß die spezifische Aktivität der cytoplasmatischen Poly(A)-Sequenzen nach 10 Minuten Inkubationszeit ein Maximum erreichte, obwohl die spezifische Aktivität der Kern-Poly(A)-Sequenzen für mehrere Stunden anstieg (43). Diese Ergebnisse sprachen gegen einen vollständigen Transport der Kern-Poly(A)-Sequenzen in das Cytoplasma und für einen intranuklearen Umsatz der Poly(A)-Sequenzen. Auf Grund dieser Daten postulierten Perry und Brandhorst (43, 44) neben einer geringen cytoplasmatischen Poly(A)-Synthese zwei verschiedene Klassen von Poly(A)-Sequenzen, die gleichzeitig zwei verschiedene Populationen von

polyadenylierter hnRNA charakterisieren: eine, die später nach ihrer Synthese polyadenyliert wird und nach weiterer Prozessierung im Cytoplasma als polyadenylierte mRNA erscheint, und eine andere hnRNA-Population, die sofort nach dem Ende ihrer Transkription polyadenyliert wird und im Kern mit einer Halbwertszeit von 25 Minuten zerfällt.

Auf Grund von Markierungsuntersuchungen scheint die Polyadenylierung der hnRNA im Zellkern ein langsamerer Prozeß als der Transkriptions-Prozeß (5000 Nukleotide/Minute) zu sein (14). Die Zeit, die notwendig ist, um 200-230 AMP-Reste in die Poly(A) Kette einzubauen (20 Minuten), ist identisch mit der Zeitverzögerung zwischen Transkription und Erscheinen der mRNA im Cytoplasma (43), wodurch eine essentielle Funktion der Poly(A)-Sequenzen im Verlauf der Prozessierung, Akkumulation und/oder Transport der polyadenylierten mRNA-Sequenzen angedeutet wurde.

Diese bedeutende Rolle der Poly(A)-Sequenzen wurde zuerst postuliert auf Grund der Hemmung des Erscheinens der mRNA in Polyribosomen von HeLa-Zellen, die mit Cordycepin behandelt worden waren (45). Sie wurden damit bestätigt, daß Sawicki und Mitarbeiter zeigten, daß nur die mRNA, die die vollständige Poly(A)-Sequenz (200-230 Nukleotide) enthielt, das Cytoplasma erreicht (14).

Die Synthese und der Metabolismus der Poly(A)-Sequenzen *in vivo* scheint ein komplexer Prozeß zu sein. Fest steht jedoch, daß unterschiedliche Vorgänge während der Poly(A)-Synthese stattfinden: *de novo* Synthese im Zellkern und Elongation der vorhandenen Poly(A)-Sequenzen im Kern und im

Cytoplasma, obwohl eine de novo Polyadenylierung von viraler mRNA im Cytoplasma von infizierten Zellen nicht ausgeschlossen werden kann (46).

Diese beiden Prozesse könnten in Zellen von zwei verschiedenen Formen der Polynukleotid-Adenyl-Transferase (E.C. 2.7.7.19) katalysiert werden. Verschiedene Formen des Enzyms sind auf Grund ihrer unterschiedlichen Affinität zu Ionen-Austauschern aus Rattenleberzellkernen (1), HeLa-Zellen (46), Hamster Embryofibroblastenzellen (47) und Hefe (17) isoliert und charakterisiert worden, obwohl keine dieser Enzyme in vitro eine spezifische Primer-Affinität zu RNA oder Oligo(A) zeigten, wie für die de novo Synthese und für den Elongations-Prozeß der Poly(A)-Sequenzen zu erwarten wäre. Dennoch sind zwei verschiedene Formen des Enzyms in Rattenleberzellkernen gefunden worden, ein Chromatin-gebundenes Enzym und ein "lösliches" Enzym, die auf Grund ihres unterschiedlichen Hemmungsgrades durch Cordycepintriphosphat für die de novo Synthese bzw. den Elongations-Prozeß der Poly(A)-Sequenzen in vivo verantwortlich sein könnten (15).

Die Poly(A)-Polymerase Reaktion wird als der Primer-abhängige Einbau von AMP aus ATP in eine Poly(A)-Kette charakterisiert.

$$RNA + n(ATP) \xrightarrow{Mn^{++} \text{ oder } Mg^{++}} RNA\text{-}(pA)n + nPP_i$$

Die Polymerisationsreaktion, die durch Poly(A)-Polymerase in vitro katalysiert wird, besitzt die gleichen Eigenschaften wie die in vivo ablaufende Reaktion:

1. Eine "nearest-neighbour" Sequenzanalyse der Reaktionspro-

dukte zeigte, daß 99% der Radioaktivität in AMP-Resten lokalisiert war (48).

2. Die Zugabe von pankreatischer RNase zu den Inkubationsansätzen hemmt vollständig den Einbau von AMP in die Polyribonukleotidkette. Demgegenüber haben DNase und Actinomycin D keinen Einfluß auf die Polymerisationsreaktion (49).

3. Die Zugabe von Poly(U) zu den Inkubationsansätzen kann den Einbau von AMP in Poly(A) nicht stimulieren (50).

4. Die Poly(A)-Sequenzen sind als 3'-5' Phosphodiester an den RNA-Primer kovalent gebunden (51).

5. Cordycepintriphosphat (3'dATP) hemmt die Synthese der Poly(A)-Kette in vitro wahrscheinlich durch Hemmung des Enzyms selbst und nicht durch seinen Einbau in die wachsende Poly(A)-Kette (1,16).

Neben der Poly(A)-Polymerase sind oft andere Nukleotid-Polymerasen in demselben Zellextrakt vorhanden, die in vitro die nichttranskriptive Synthese von Poly(U), Poly(C) und Poly(G) aus UTP, CTP und GTP katalysieren (6,52,53,54,55,56). Da die Präsenz von Oligonukleotid-Sequenzen in der hnRNA als mögliche Erkennungs-Sequenzen für die Prozessierung dieser Moleküle dienen könnten, ist die Charakterisierung der Poly(U)-, Poly(C)- und Poly(G)-Polymerase von großem Interesse. Untersuchungen z.B. über die Primer-Spezifität dieser Enzyme könnten auf die Funktion der Enzyme in vivo hinweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Nukleotid-Polymerasen (Poly(A)-, Poly(U)-, Poly(C)- und Poly(G)-Poly-

merase) aus Zellkernen von Rattenlebern und Ascitestumorzellen zu isolieren und zu charakterisieren; ferner wurde die Möglichkeit der nichttranskriptiven Synthese der Oligo(U)-Sequenzen am 5'-Ende der hnRNA durch die Poly(U)-Polymerase untersucht. Die Existenz der Nukleotid-Polymerasen in demselben Zellextrakt stellte die Frage, ob in vitro durch das Zusammenwirken der Poly(A)-, Poly(U)-, Poly(C)- und Poly(G)-Polymerase nichttranskriptiv Ribonukleotid-Copolymere, d.h. Ribonukleinsäuren, synthetisiert werden können. Diese Untersuchungen sind vor allem deswegen von Bedeutung, da etwa 5-7% der Kern-RNA-Synthese durch Actinomycin D nicht hemmbar sind, also wahrscheinlich unabhängig von einer DNA-Matritze synthetisiert werden (57).

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

Ausgangsmaterial für die Versuche waren:

a) Leber von männlichen Wistar BR II Ratten (100-160g), die von der Tierzüchterei Brünger in Halle/Westfalen bezogen wurden

b) Ehrlich Ascitestumorzellen

(^{3}H)-ATP (15 Ci/mmol), (^{3}H)-GTP (2 Ci/mmol), (^{3}H)-CTP (25 Ci/mmol), (^{3}H)-UTP (2 Ci/mmol) und (^{3}H)-Adenosin (24 Ci/mmol) wurden von The Radiochemical Center Amersham bezogen; (^{3}H)-Uridin (25 Ci/mmol) von New England Nuclear (Dreieichenhain); synthetische Oligonukleotide und Oligo(dT)-Cellulose von Collaborative Research Inc. (Massachusetts); Actinomycin D von Serva (Heidelberg); 2'dATP, 2'-Desoxyadenosin, Ribonuklease T_1 (300.000 U/mg) und Poly(A) von Boehringer (Mannheim); Cordycepin und Poly(U) von Sigma (München); pankreatische Ribonuklease A (3.290 U/mg) von Worthington (New Jersey); CN-Br-aktivierte Sepharose 4B von Pharmacia (Uppsala); NCS 0,6 N von Amersham/Searle und PEI-Cellulose Platten (20 x 20cm) von Merck (Darmstadt). Von Herrn Prof. Dr. K. Seifart wurde α-Amanitin und von Dr. K. Scheit (Göttingen) Cordycepintriphosphat freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Alle anderen Chemikalien wurden in p.a. Qualität von der Firma Merck (Darmstadt) geliefert.

Puffer:

Puffer A (TSS-Puffer):	0,05M Tris-HCl pH 7,5, 0,25M Saccharose, 0,01M $MgCl_2$, 0,025M KCl
Puffer B (Nukleotid-Polymerase-Extraktionspuffer):	0.075M Tris-HCl pH 7,9, 1M $(NH_4)_2SO_4$, 0,25mM EDTA, 2mM $MgCl_2$, 5mM 2-Mercaptoäthanol, 20% Glycerin
Puffer C:	10mM Tris-HCl pH 7,9, 0,4M NH_4Cl, 2mM $MgCl_2$, 2mM 2-Mercaptoäthanol, 0,25mM EDTA, 20% Glycerin
Puffer D:	10mM Tris-HCl pH 8,4, 1mM 2-Mercaptoäthanol, 20% Glycerin
Puffer E:	10mM Tris-HCl pH 7,9, 50mM NH_4Cl, 2mM $MgCl_2$, 2mM 2-Mercaptoäthanol, 0,25mM EDTA, 20% Glycerin
Puffer F (Lysis-Puffer):	10mM Tris-HCl pH 7,4, 0,14M NaCl, 10mM KCl, 1,5mM $MgCl_2$, 0,1% Triton X-100
Puffer G:	10mM Tris-HCl pH 7,4, 10mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% SDS

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung der Nukleotid-Polymerasen aus Rattenleberzellkernen.

Alle Schritte der Isolierung und Reinigung der Nukleotid-Polymerasen wurden bei einer Temperatur zwischen 0 und 4°C durchgeführt. Ratten (20-25 Stück) wurden durch cervikale Dislokation getötet und der Bauchraum eröffnet. Nach Durchspülung der Leber mit 10ml eiskaltem TSS-Puffer durch die Pfortader wurde die Leber entfernt, mit einer Schere grob zerkleinert und in 3 Volumen TSS-Puffer mit Hilfe eines Glas-Teflon-Homogenisators homogenisiert. Das Homogenat wurde durch zwei Lagen Mull filtriert und bei 1.500 x g für 5 Minuten zentrifugiert, wobei eine grobe Trennung von Kern und Cytoplasma erreicht wurde. Das Kern-Sediment wurde in 2,2M Saccharose-TSS-Puffer resuspendiert und auf ein Kissen (6ml) von 2,2M Saccharose-TSS-Puffer überschichtet (27). Nach Zentrifugation (26.000 upm, 90 Minuten, SW 27 Rotor) bildeten die Kerne ein weißliches Sediment, das anschließend in 100ml Nukleotid-Polymerase Extraktionspuffer aufgenommen und homogenisiert wurde. Die Kern-Suspension wurde ultrabeschallt (Branson Sonifier 125 W; 6x15 Sekunden mit Pausen von 10 Sekunden), wodurch eine Zerstörung der Kernstrukturen und eine Herabsetzung der Viskosität durch Verringerung der Molekülgröße der DNA erreicht wurde. Anschließend wurde der Kern-Extrakt zwei Stunden gerührt. Danach wurden die Proteine durch Zugabe von $(NH_4)_2SO_4$ (65% Sättigung) und Zentrifugation (48.000 x g, 30 Minuten) von dem größten Teil der Nukleinsäuren abgetrennt.

Um die Proteine wieder in Lösung zu bringen, mußte die Ionenstärke des Protein-Extrakts herabgesetzt werden, wozu das Protein-Sediment in 10ml Puffer C aufgenommen und gegen ein 100faches Volumen des gleichen Puffers über Nacht dialysiert wurde. Die unlöslichen Proteine wurden durch Zentrifugation bei 48.000 x g für 30 Minuten sedimentiert. Anschließend wurde der Überstand auf eine Bio-Gel A 1,5m Säule (4x80cm) aufgetragen; Fraktionen zu 10ml wurden bei einer Flußrate von 18ml pro Stunde gesammelt. Die Fraktionen, die die Nukleotid-Polymerase-Aktivitäten enthielten, wurden gepoolt und mit Hilfe der Ultrafiltration in einer Amicon-Kammer (PM 10 Membran) auf ein Endvolumen von 10ml konzentriert.

Dieser Ultrafiltrationsschritt bewirkt neben der Konzentrierung der Proteine auch eine geringe Reinigung des Kern-Extraktes, da alle Proteine, die ein niedrigeres Molekulargewicht als 10.000 Dalton haben, die PM 10 Membran passieren.

Das Protein-Konzentrat wurde über Nacht gegen ein 100-faches Volumen von Puffer D dialysiert, anschließend zentrifugiert (48.000 x g, 30 Minuten) und auf eine DEAE-Sephadex A-25 Säule (1,85 x 5cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit 15-20ml Puffer D gewaschen und danach mit 0,15M NaCl in Puffer D eluiert. Die gelaufenen und die eluierten Fraktionen wurden gepoolt, durch Ultrafiltration auf 10ml konzentriert und gegen Puffer D über Nacht dialysiert. Die vorgereinigte Enzympräparation wurde an eine CM-Cellulose Säule (1,85x3cm) adsorbiert und anschließend mit fünf Säulen-Volumen Puffer D nachgewaschen. Die Elution der Nukleotid-Polymerasen vom Austauscher erfolgte mittels eines linearen Salzgradienten (30+30ml;

50mM NaCl-120mM NaCl in Puffer D). Fraktionen von 2ml wurden bei einer Flußrate von 5ml/Std. gesammelt. Unter diesen Bedingungen eluierten die Poly(A)-Polymerase Form A und B (1) gemeinsam mit der Nukleotid-Polymerase. Die enzymatisch aktiven Fraktionen wurden vereinigt und für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

2.2.2. Isolierung der Nukleotid-Polymerasen aus Ehrlich Asciteszellkernen.

Die Extraktion und Isolierung des Enzyms erfolgte grundsätzlich wie in 2.2.1. für die Enzyme aus Rattenleberzellkernen beschrieben.

Ehrlich Asciteszellen wurden entweder aus einer Zellkultur in Eagle's Minimum Essential Medium mit 5% Kälberserum ($10\text{-}15 \times 10^5$ Zellen/ml) oder aus der Peritonealflüssigkeit von Swiss Mäusen sieben Tage nach Übertragung gewonnen. 15l Medium oder 100ml Asciteszellen aus 20 Mäusen wurden bei 1.000 x g 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet mit isotonischem Puffer (0,14M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7,4) zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 60-80ml Lysis-Puffer suspendiert, 4 Minuten im Eis stehen gelassen und mit 20 Strokes in einem Glas-Dounce-Homogenisator homogenisiert. Die Zellkerne wurden nach Zentrifugation des Homogenats bei 1.000 x g für 10 Minuten mit isotonischem Puffer gewaschen und in 80-100ml Nukleotid-Polymerase-Extraktionspuffer aufgenommen.

Die Untersuchung der Kernsuspension durch Phasenkontrastmikroskopie zeigte keine cytoplasmatischen Kontaminationen. Die

Kernsuspension wurde mit Hilfe des Ultraturrax homogenisiert und anschließend ultrabeschallt (Branson Sonifier 125W) bis die Lösung flüssig wurde (Zerstörung der Kern- und DNA-Strukturen). Die Kernproteine wurden nach Zugabe von kristallinem Ammoniumsulfat (3,3 g/10ml) gefällt und durch Zentrifugation bei 48.000 x g für 30 Minuten als Proteinpellet gewonnen. Dieses wurde in 5-8ml Puffer C aufgenommen, gegen ein 100-faches Volumen des gleichen Puffers 3 Stunden dialysiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Sephadex G-200 Säule (3,2x60cm) aufgetragen. Fraktionen zu 10ml wurden bei einem hydrostatischen Druck von 16cm gesammelt. Die Nukleotid-Polymerase-Fraktionen wurden gepoolt und mit Hilfe der Ultrafiltration (PM 10 Membran) bis zu 10ml konzentriert.

Die NaCl-Konzentration der Protein-Lösung wurde auf 0,2M durch Dialyse gegen Puffer D + 0,2M NaCl herabgesetzt. Die Chloridkonzentration wurde durch Titration gegen $AgNO_3$ und $FeCl_3$ als Indikator kontrolliert. Anschließend wurde das Dialysat zentrifugiert (48,000 x g, 30 Minuten) und der Überstand auf eine DEAE-Sephadex A-25 Säule (1,85x5cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit 15-20ml Puffer D + 0,2M NaCl gewaschen. Die Durchlauf-Fraktionen wurden durch Ultrafiltration bis auf 10ml konzentriert und bei $-80^{o}C$ aufbewahrt. Diese Präparation enthielt die Nukleotid-Polymerase-Aktivitäten und wurde für die Enzymcharakterisierung weiter verwendet.

2.2.3. Bestimmung der Aktivität der Nukleotid-Polymerasen.

a) Synthese von Ribonukleotid-Homopolymeren

Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 200µl: 20mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM Creatinphosphat, 5µg Creatinphosphokinase, 0,1mM je (^{3}H)-markiertes ATP, CTP, UTP bzw. GTP (2-4 µCi), 0,2 A_{260} Einheiten Kern-RNA, 5mM 2-Mercaptoäthanol, 7,5mM $MnSO_4$ und 130µl der entsprechenden Fraktion nach Säulen-Chromatographie. Für den Nukleotid-Polymerase-Test des Enzyms aus Ehrlich Asciteszellkernen wurden 5mM $MnSO_4$ und nur 50µl der Säulen-Chromatographie-Fraktion eingesetzt.

Die Inkubation wurde entweder 90 oder 120 Minuten lang bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 20µl einer SDS-Lösung (0,1M Natriumpyrophosphat, 2% Natrium Dodecylsulfat in 50mM Tris-HCl pH 7,5) gestoppt. 180µl des Inkubates wurde auf ein Papierplättchen pipettiert (4x4cm, Schleicher & Schüll 2043 b) und in eiskalter 5%iger TCA präzipitiert. Die Plättchen wurden fünfmal mit 5% TCA gewaschen, anschließend mit Methanol und Aceton. Die Einbaurate der markierten Nukleotide in TCA-fällbares Material wurde in T-Fluor (5g PPO und 200mg POPOP in 1l Toluol) mit Hilfe eines Szintillationszählers (Mark I, Nuclear Chicago oder LKB) gemessen.

b) Synthese von Ribonukleotid-Copolymeren

Die Synthese des Ribonukleotid-Copolymers wurde in 10-fachem Reaktionsansatz (Endvolumen 2ml) entsprechend der Ribonukleotid-Homopolymersynthese durchgeführt. Die Nukleosidtriphosphate wurden in einer Konzentration von $0,25x10^{-4}$M eingesetzt, um eine Endkonzentration von 0,1mM im Inkubations-

ansatz zu erreichen. Die Inkubationszeit und die Bestimmung der Einbaurate der Nukleosidtriphosphate wurden wie zuvor angegeben durchgeführt.

Die Proteinkonzentration der Fraktionen nach Säulen-Chromatographie wurde nach der Methode von Lowry bestimmt (28).

2.2.4. Präparation des ATP-Sepharose Gels.

Das ATP-Sepharose Gel wurde nach der Methode von Lamed präpariert (2). ATP wurde an Sepharose 4B mittels eines Adipinsäure-Derivats gebunden.

a) Synthese des Adipinsäure-Derivats
100ml Adipinsäure-Diäthylester wurden zusammen mit 200ml Hydrazin und 200ml Äthanol unter Rückfluß für drei Stunden erhitzt. Das gebildete Adipinsäure-Dihydrazid präzipitiert aus der Lösung und wurde aus einer Äthanol-Wasser-Mischung rekristallisiert (Schmelzpunkt: 169-171°C).

$$NH_2NH\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}(CH_2)_4\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}NH\text{-}NH_2$$ Adipinsäure-Dihydrazid

b) Bindung des Adipinsäure-Derivats an Sepharose 4B
Bromcyanid-aktivierte Sepharose 4B wurde von Pharmacia bezogen. 3g CNBr-Sepharose 4B wurden in 10ml 0,1M Natriumcarbonat-Puffer pH 9,5 suspendiert und mit einem Volumen kaltem Adipinsäure Dihydrazid in Natriumcarbonat-Puffer (9g Adipinsäure-Derivat/100ml Puffer) versetzt. Die Reaktion wurde bei 4°C 16 Stunden unter ständigem Rühren durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit Wasser (1l) und 0,2M NaCl-Lösung (1l) gewaschen bis die Waschflüssigkeit keine Reaktion

mit Trinitrobenzensulfonat mehr zeigte (29).

CNBr-aktivierte
Sepharose 4B

c) Oxidation von ATP

Eine kalte, neutrale ATP-Lösung (0,04M) wurde mit Natriumperjodat (0,036M) versetzt und die Mischung 1 Stunde bei $0^{o}C$ im Dunkeln inkubiert.

d) Kopplung des oxidierten ATP's an das Sepahrose 4B Derivat.

20ml Sepharose-Hydrazid-Gel und 100µmol oxidiertes ATP wurden in 20ml 0,2M Natrium-Acetat-Puffer pH 5 zwei Stunden bei $4^{o}C$ gerührt. Anschließend wurde das ATP-Sepharose-Gel mit 1l 1M NaCl und 1l destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde das Gel in 20ml Puffer E suspendiert und bei $4^{o}C$ bewahrt.

e) Reinigung des Rinderserum Albumins

10mg/ml Rinderserum Albumin in 50mM Acetat-Puffer pH 5,6 wurden auf eine Doppel-Säule (2,3x18,5cm) aufgetragen (oben CM-Cellulose und unten DEAE-Cellulose), die mit Acetat-Puffer äquilibriert war. Anschließend wurde die Säule mit 10ml Acetat-Puffer gewaschen. Das Rinderserum Albumin wurde in den Durchlauf-Fraktionen wiedergefunden. Die Ribonuklease-Aktivität des Albumins nach der Chromatographie betrug 0-2%, gemessen als Abbau einer (^{3}H)-RNA (in put: 12.711cpm) bei $37^{o}C$ in Gegenwart von ATP ($10^{-4}M$) und Mn^{++} (7,5mM).

2.2.5. Gel-Elektrophorese

a) Polyacrylamid-SDS-Gele

Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wurde nach der Methode von Laemmli durchgeführt (30). Ein Trenngel (15% Polyacrylamid) und ein Sammelgel (7,5% Polyacrylamid) wurden aus einer 30% Acrylamid-0,8% N, N' bis-Methylenacrylamid Stock-Lösung angesetzt. Das Trenngel enthielt 15% Polyacrylamid, 0,375mM Tris-HCl pH 8,8 und 0,1% SDS. Die Gele wurden durch Zugabe von 0,05% (v/v) Tetramethyläthylendiamin (TEMED) und 0,1% Ammonium Persulfat polymerisiert (30 Minuten). Das Sammelgel bestand aus 7,5% Polyacrylamid, 0,375mM Tris-HCl pH 6,8 und 0,1% SDS. Die Polymerisierung erfolgte mittels 0,1% (v/v) TEMED und 0,03% Ammonium Persulfat nach 30 Minuten bei Raumtemperatur. Beide Acrylamid-Lösungen wurden vor Zugabe von TEMED und Ammonium Persulfat entgast und dann zwischen zwei Glasplatten (10x15x0,13cm) gegossen. Der Elektroden-Puffer enthielt 0.025M Tris-HCl pH 8,3, 0.192M Glycin und 0,1% SDS. Die Proben (8-10µl) wurden mit zweifach konzentriertem Laemmli-Puffer (0,1M Tris-HCl pH 6,8, 0,2% SDS. 2% (v/v) 2-Mercaptoäthanol und 20% (v/v) Glycerin) versetzt, erhitzt und auf das Platten-Gel aufgetragen.

b) Polyacrylamid-Formamid-Gele

Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese in 99% Formamid wurde nach der Methode von Pinder durchgeführt (19). Die Rundgele (1x10cm) waren aus 1,7g Acrylamid, 0,3g N,N' bis-Methylenacrylamid und 0,02M Diäthylbarbitursäure pH 9,0 in 20ml gereinigtem Formamid zusammengesetzt. Die Polymerisierung er-

folgte durch Zugabe von 0,2% (v/v) TEMED und 0,12% (v/v) Ammonium Persulfat. Das Formamid (100ml) wurde in Gegenwart von dem Ionenaustauscher Dowex AG 50 W x 8 eine Stunde bei Raumtemperatur unter konstantem Rühren gereinigt.

Die Elektrophorese-Kammer wurde mittels einer Polyacrylamid-Brücke mit der Elektroden-Kammer verbunden. Die Polyacrylamid-Brücke enthielt in 100ml 1M KCl, 4,75g Acrylamid, 0,25g N,N' bis-Methylenacrylamid, 0,2% (v/v) TEMED und 0,12% Ammonium Persulfat. Der Laufpuffer in der Elektrophorese-Kammer enthielt 0,01M NaCl und der Puffer in der Elektroden-Kammer 3M KCl.

Die Gele wurden nach der Polymerisierung mit 70% Formamid-0,02M Barbital-Puffer pH 9,0 überschichtet. Die RNA-Proben (8-15µl) wurden in 90% Formamid-0,02M Barbital-Puffer pH 9,0 + 5% Sucrose gelöst und auf das Gel aufgetragen.

2.2.6. RNA-Extraktion

a) aus Ehrlich Asciteszellkernen

Die Kerne aus Asciteszellen wurden wie in 2.2.2. beschrieben gewonnen. Nach Zell-Lysis und Zentrifugation wurden die Zellkerne in 10ml RNA-Extraktionspuffer (50mM Natrium-Acetat pH 5,1, 5mM EDTA) resuspendiert. Die Kern-Suspension wurde mit SDS (0,5% Endkonzentration) und gleichem Volumen wassergesättigtem Phenol versetzt und im Wasserbad auf 65°C erhitzt. Die Mischung wurde nach kräftigem Schütteln (5x1 Minute, Pausen von 1 Minute) abgekühlt und zentrifugiert (16.000 x g, 10 Minuten). Die wäßrige Phase wurde mit einem gleichem Vo-

lumen Phenol und SDS (0,5%) versetzt und der gesamte Schritt einmal wiederholt. Anschließend wurde die wäßrige Phase mit Chloroform bei Raumtemperatur zweimal extrahiert. Die RNA-haltige Phase wurde mit LiCl (Endkonzentration 0,2M) und 2,5 Volumen Äthanol versetzt. Die RNA fiel bei -20°C über Nacht aus der Lösung aus. Ein RNA-Pellet wurde nach Zentrifugation bei 23.500 x g für 20 Minuten gewonnen. Die RNA wurde quantitiert (Absorption bei 260nm, Strahlenweg 1cm, wobei 1 O.D. = 40µg RNA/ml) und ihre eingebaute Radioaktivität im TCA-fällbaren Material gemessen.

b) aus Ehrlich Asciteszellcytoplasma

Der nach Zell-Lysis und anschließender Zentrifugation gewonnene Überstand wurde für die Extraktion der cytoplasmatischen RNA verwendet. Durch eine weitere Zentrifugation (23.500 x g, 15 Minuten) wurden Zellmembranen, Mitochondrien und andere Zellorganellen von dem Überstand getrennt. Anschließend wurde der Überstand auf eine Endkonzentration von 0,5% SDS gebracht und mit einem gleichem Volumen Phenol: Chloroform 1:1 versetzt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 10 Minuten geschüttelt, danach abgekühlt und die Phenol- und die wäßrige Phase durch Zentrifugation (16.000 x g, 10 Minuten bei 4°C) abgetrennt. Die wäßrige Phase wurde mit einem gleichem Volumen Chloroform versetzt und die RNA-Extraktion wie für die Kern-Extraktion beschrieben weitergeführt.

2.2.7. "Nearest-Neighbour" Sequenzanalyse

Die Nukleotid-Polymerasen wurden in 10-fachen Reaktionsansätzen in Gegenwart der vier Nukleosidtriphosphate (Endkon-

zentration 10^{-4}M), jeweils eins davon α-^{32}P-markiert (5µCi), 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze auf eine Endkonzentration von 0,5% SDS gebracht, mit einem gleichem Volumen Chloroform: Phenol 1:1 versetzt und drei Minuten bei Raumtemperatur stark geschüttelt. Die Proben wurden abgekühlt und bei 16.000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde nochmals extrahiert und mit NaCl (0,2M) und 2,5 Volumen kaltem Äthanol versetzt. Die RNA wurde bei -20°C über Nacht aus der Lösung gefällt. Das Sediment wurde nach Zentrifugation (10.000 x g, 20 Minuten) in 1ml Wasser gelöst und von den freien Nukleosidtriphosphaten durch Gelfiltration über Sephadex G-50 (2x88cm) getrennt. Die RNA-enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und die RNA mit 2,5 Volumen Äthanol über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation wurde das Sediment in 500µl einer 0,3N KCl-Lösung aufgenommen und 18 Stunden hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit 0,6N Perchlorsäure bei 0°C neutralisiert und das Perchloratsalz durch Zentrifugation (23.500 x g, 10 Minuten bei 4°C) entfernt. Der Überstand wurde lyophilisiert und der Rückstand in zweimal destilliertem Wasser gelöst (Endkonzentration 1,6mg/ml). Die Trennung der Nukleosidmonophosphate erfolgte durch Dünnschicht-Chromatographie auf PEI-Cellulose Platten (18). 8-10µl der Nukleotid-Lösungen wurden auf die Platte aufgetragen und das Nukleosidmonophosphat durch aufsteigende Chromatographie erst mit 0,1M Essigsäure (bis zu 4cm über der Auftragslinie) und anschließend mit 0,3M LiCl (bis zu 9cm über der Auftragslinie) getrennt. Die PEI-Cellulose Platte wurde mit Warmluft getrocknet und in 1cm breite Streifen geschnitten. Die Cellu-

lose-Streifen wurden über Nacht in 5ml NCS + T-Fluor gelöst und die Radioaktivität in einem LKB-Szintillationszähler gemessen.

2.2.8. Isolierung der Poly(A)- und Oligo(U)-Sequenzen aus Kern-RNA.

a) Isolierung der Poly(A)-Sequenzen

Kern-RNA aus Asciteszellen wurde wie in 2.2.6. beschrieben gewonnen. Die Kontamination durch DNA im RNA-Pellet nach Äthanol-Fällung wurde vermindert, indem das RNA-Pellet mit 2ml 3M Natrium Acetat pH 5,0 gewaschen wurde. Nach Zentrifugation (23.500 x g, 20 Minuten bei 4°C) wurde das Pellet in 0,7ml 0,3M Natrium-Chlorid-0,03M Natrium Citrat-10mM Tris-HCl pH 7,4 gelöst. Aliquots (100µl) wurden entnommen und die RNA-Konzentration (Absorption bei 260nm) und der (^{3}H)-AMP-Einbau in der gesamten Kern-RNA bestimmt. Die Probe wurde anschließend mit Ribonuklease A (2,5µg/ml) und Ribonuklease T_1 (5 Einheiten/ml) 30 Minuten bei 37°C verdaut. Die Reaktion wurde mit SDS (Endkonzentration 0,5%) beendet und die verdaute Probe durch Glas-Filter (Whatman GF/C, 2,5cm) filtriert. Die Filter wurden fünfmal mit kalter 5% TCA gewaschen und anschließend mit Methanol und Aceton. Die Radioaktivität in dem TCA-fällbaren Material (hauptsächlich Poly(A)-Sequenzen) wurde in T-Flour in einem Szintillationszähler gemessen.

b) Isolierung der Oligo(U)-Sequenzen

Die Kern-RNA wurde isoliert und mit Natrium Acetat-Puffer gewaschen wie zuvor beschrieben. Das RNA-Pellet wurde an-

schließend in 0,7ml Hybridisierungs-Puffer gelöst (0,1M Tris-HCl pH 7,6, 0,15M NaCl, 0.015M Natrium Citrat) und seine Konzentration und Radioaktivität bestimmt. Die Probe wurde gegen Poly(A) (10µg/ml) 60 Minuten bei 30°C hybridisiert. Anschließend wurde die Puffer-Konzentration auf 0,3M NaCl erhöht und die nicht-hybridisierten RNA-Sequenzen mit Ribonuklease A und Ribonuklease T_1 verdaut wie zuvor angegeben. Die Oligo(U) · Poly(A) Hybride wurden auf Glas-Filtern gesammelt und ihre Radioaktivität gemessen.

c) Trennung der Poly(A)$^+$-RNA von der Poly(A)$^-$-RNA
Die Kern-RNA aus Asciteszellen wurde in Poly(A)$^+$- und Poly(A)$^-$-RNA auf Oligo(dT)-Cellulose getrennt. Kern-RNA wurde isoliert, mit Natrium Acetat (3M) gewaschen und in 1ml Bindungs-Puffer gelöst (0,1M NaCl, 0,01M EDTA, 0,01M Tris-HCl pH 7,2 und 0,5% SDS). Die RNA-Probe wurde auf 60°C erhitzt, abgekühlt und bei Raumtemperatur auf eine Oligo(dT)-Cellulose Säule (1,2x8cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit 15ml Elutions-Puffer (Bindungs-Puffer ohne NaCl) bei 60°C eluiert. Fraktionen von 1ml wurden gesammelt. Die RNA in den Durchlauf-Fraktionen wurde als Poly(A)$^-$-RNA bezeichnet. Die Elutions-Fraktionen enthielten die Poly(A)$^+$-RNA (13).

III. ERGEBNISSE

3.1. Weitere Reinigung der Poly(A)-Polymerase aus Rattenleberzellkernen durch Affinitätschromatographie an ATP-Sepharose.

In Extrakten aus Rattenleberzellkernen lassen sich drei verschiedene Formen der Poly(A)-Polymerase nachweisen, die durch Chromatographie an CM-Cellulose in zwei Mn^{++}-abhängige und ein Mg^{++}-abhängiges Enzym aufgetrennt werden konnten (1). Zusammen mit der Mg^{++}-abhängigen Poly(A)-Polymerase eluierten drei weitere Enzymaktivitäten, die die nicht-transkriptive Synthese der Ribonukleotid-Homopolymeren Poly(C), Poly(U) und Poly(G) katalysieren. Substrate dieser Polymerisierungsreaktion sind die entsprechenden Nukleotide CTP, UTP und GTP.

Um diese Enzymaktivitäten weiter zu reinigen und aufzutrennen, wurde die Affinitätschromatographie an immobilisiertem Substrat (ATP) angewandt. Aufgrund der vermuteten unterschiedlichen Affinität der Nukleotid-Polymerasen zu ATP war eine Auftrennung der verschiedenen Polymeraseaktivitäten zu erwarten. ATP-Sepharose wurde nach der Methode von Lamed (2) vorbereitet, wobei mit Perjodat-oxidiertem ATP an Sepharose 4B Adipinsäure Dihydrazid in Natriumacetat-Puffer kovalent gebunden wurde (s. Methoden und Abbildung 1). Auf diese Weise konnten 2,5-2,5µMol des oxidierten ATP's pro ml Sepharose gebunden werden. Das Adipinsäurederivat dient als Arm zwischen der Sepahrose und dem ATP, es erleichtert dadurch sterische Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und dem ge-

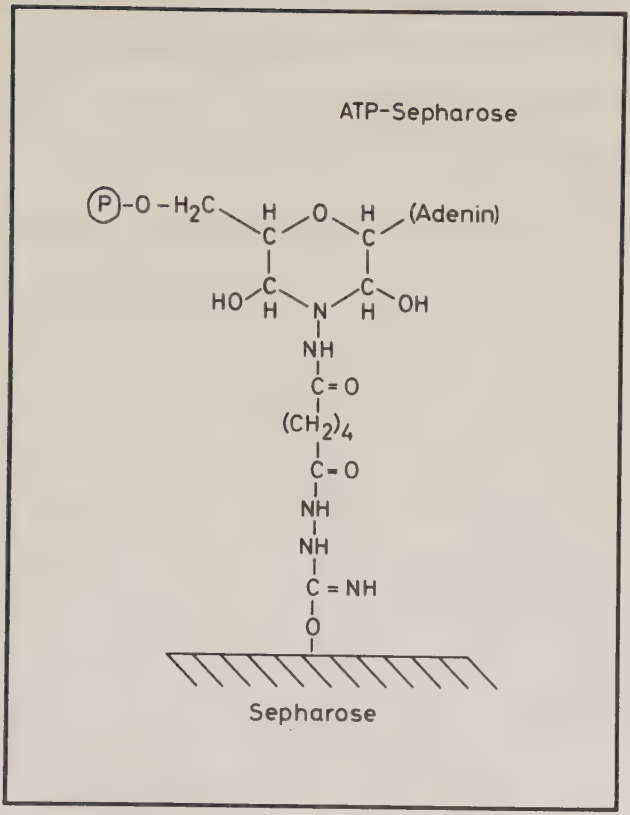

Abbildung 1: Struktur des ATP-Sepharose-Gels.

bundenen ATP-Molekül. Wegen des neutralen Charakters des Adipinsäurederivates sind unspezifische ionische Bindungen mit dem Enzym nicht zu erwarten, hingegen sind hydrophobe Wechselwirkungen möglich. Tatsächlich zeigten erste Versuche, daß die Poly(A)-Polymerase irreversibel an die ATP-Matrix gebunden wurde; nur ein geringer Teil der Enzymaktivität konnte wieder durch ATP- oder Salz-Gradienten von der ATP-Sepharose Säule eluiert werden. Um dieses Problem zu lösen,

wurde die ATP-Sepharose mit 2mg/ml vorgereinigtem Rinderserum Albumin (3) in Puffer E gründlich gewaschen. Albumin bindet spezifisch an hydrophobe Ketten (4) und verhindert damit die hydrophobe Wechselwirkung zwischen Enzym und ATP-Sepharose-Matrix.

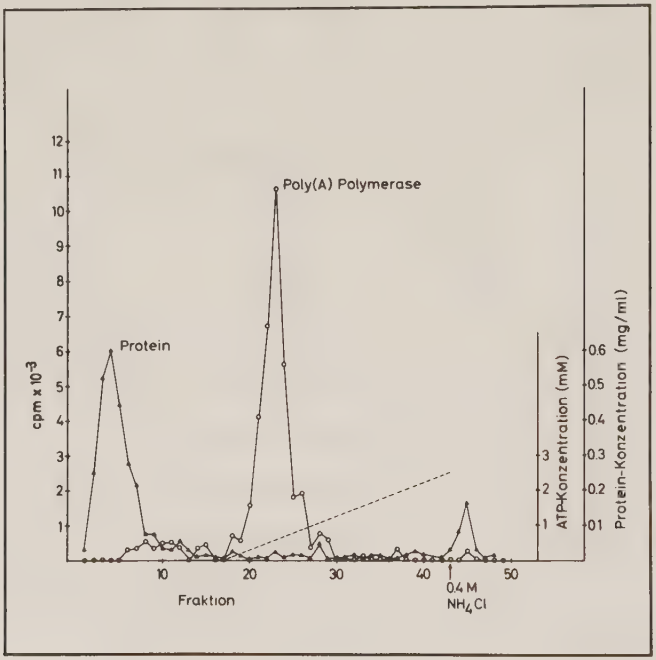

Abbildung 2: Affinitäts-Chromatographie von Poly(A)-Polymerase an ATP-Sepharose. Poly(A)-Polymerase aus Rattenleberzellkernen wurde nach Gelfiltration auf Bio-Gel A-1,5m und DEAE-Sephadex-Chromatographie an eine 1,3x8cm ATP-Sepharose-Säule gebunden. Die Elution des Enzyms erfolgte mittels eines ATP-Gradienten (30+30ml, 0 auf 3mM in Puffer E) mit einer Flußrate von 21ml pro Stunde. Fraktionen von 2,5ml wurden gesammelt.

Abbildung 2 zeigt das Poly(A)-Polymerase Profil nach Affinitätschromatographie an ATP-Sepharose. Die Poly(A)-Polymerase

wurde vorher durch Gelfiltration an Bio-Gel A-1,5m und DEAE-Sephadex Chromatographie teilweise gereinigt und bei einem Proteingehalt von 1mg/ml in Puffer E an die ATP-Sepharose gebunden. Obwohl mehr als 90% des Proteingehalts des Auftrages ungebunden durch die Säule hindurchläuft, konnte keine Poly(A)-Polymerase Aktivität in den Durchlauf-Fraktionen festgestellt werden. Die Poly(A)-Polymerase wurde mit einem ATP-Gradienten (0-3mM) bei 0,9mM ATP spezifisch eluiert. Etwa 50% der im Auftrag gemessenen Enzymaktivität konnte in den Elutions-Fraktionen der ATP-Sepharose Säule wiedergefunden werden. In den enzymatisch aktiven Fraktionen wurden 4-6µg Protein pro ml gemessen. Nach dem ATP-Gradienten wurde die Säule mit 0,4M NH_4Cl gewaschen, wodurch eine geringe Menge an aktivem Enzym eluierte (1% der gesamten Enzymaktivität der Poly(A)-Polymerase).

Die relativ hohe ATP-Konzentration in den Elutions-Fraktionen würde den Nachweis der Poly(A)-Polymerase durch Substrathemmung und durch zu starke Verdünnung des radioaktiven ATP's beeinträchtigen. Deswegen wurde das ATP durch Dialyse oder durch Bindung an eine DEAE-Sephadex Säule, die direkt an die ATP-Sepharose Säule angeschlossen wurde, aus den Elutions-Fraktionen entfernt. In einem Kontrollversuch wurde Poly(A)-Polymerase in Gegenwart von 1mM ATP auf die ATP-Sepharose Säule aufgetragen. Unter diesen Bedingungen wurden 100% der Enzymaktivität in den Durchlauf-Fraktionen wiedergefunden. Das ist ein weiterer Hinweis dafür, daß die Bindung der Poly(A)-Polymerase spezifisch über das ATP-Molekül erfolgt. In einigen Versuchen wurde die Poly(A)-Polymerase mit einem

Salz-Gradienten (0,05-0,4M NH_4Cl) bei 0,175M NH_4Cl von der ATP-Sepharose Säule eluiert. In diesem Fall war die Proteinkonzentration der polymerasehaltigen Fraktionen erheblich höher (10-fach) durch die gleichzeitige unspezifische Elution anderer Proteine. Wider Erwarten konnten die Nukleotid-Polymerasen (Poly(U)-, Poly(C)- und Poly(G)-Polymerase) nur teilweise von der Poly(A)-Polymerase Aktivität durch Affinitätschromatographie getrennt werden (Abb.3). Nach Adsorption

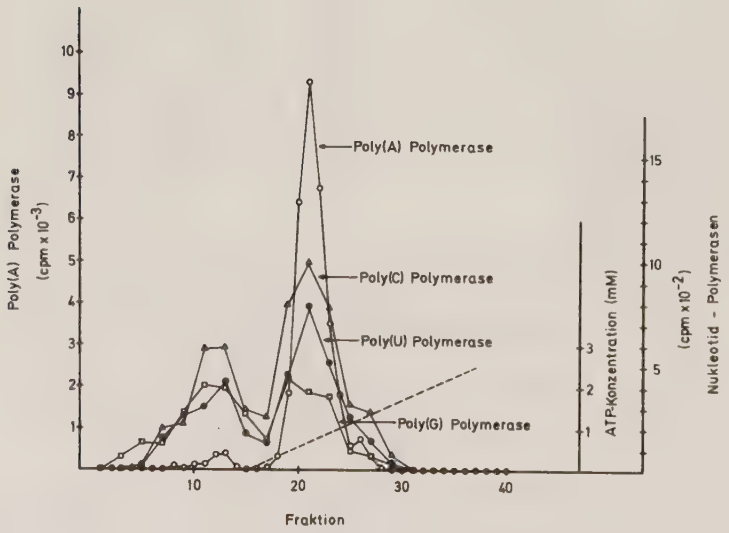

Abbildung 3: Affinitäts-Chromatographie von Nukleotid-Polymerasen an ATP-Sepharose. Die Affinitäts-Chromatographie wurde wie in Abb.2 beschrieben durchgeführt.

an ATP-Sepharose eluieren alle Polymerase-Aktivitäten gemeinsam bei 0,9mM ATP. Die Bindung der Nukleotid-Polymerasen an ATP-Sepharose und ihr Elutions-Profil, das mit dem der Poly(A)-Polymerase identisch ist, zeigt eine ähnliche Affinität beider Enzyme zu ATP. In der Tat haben frühere Ergebnisse gezeigt, daß ATP den Einbau von UMP, CMP und GMP in Poly(U), Poly(C) und Poly(G) stark hemmen konnte, wahrscheinlich durch Bindung an die Nukleotid-Polymerasen selbst (5).

3.1.1. SDS-Gelelektrophorese der Poly(A)-Polymerase nach ATP-Sepharose-Chromatographie und Analyse der Polymerisationsprodukte des Enzyms.

Die Poly(A)-Polymerase aus Rattenleberzellkernen wurde durch Affinitätschromatographie an ATP-Sepharose 1557-fach gereinigt (Tabelle 1). Trotz dieses hohen Reinigungsgrades zeigt eine Analyse der Polymerase-Fraktionen nach ATP-Sepharose durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese noch einen gewissen Anteil an kontaminierenden Proteinen (Abb.4, Spur 6).

	Protein-Gehalt	Spezifische Aktivität (nMol ATP/ mg Protein)	Reinigungs-grad -fach
Zellkern-Extrakt	102,8	0,23	1,0
Gelfiltration	64,0	2,48	10,8
DEAE-Sephadex	6,7	22,16	96,3
ATP-Sepharose	0,012	358,21	1557,4

Tabelle 1: Reinigungs-Schema der Poly(A)-Polymerase.

Eine weitere Reinigung des Enzyms durch CM-Cellulose-Chromatographie führte zum Verlust der Enzymaktivität, wahrscheinlich wegen der geringen Proteinmenge und der Labilität des Enzyms.

Gewöhnlich zeigt die mit den konventionellen chromatographischen Methoden isolierte Poly(A)-Polymerase geringe Nukleaseaktivitäten. Durch Affinitätschromatographie an ATP-Sepharose konnte diese kontaminierende Ribonukleaseaktivität fast völlig aus der Poly(A)-Polymerase Präparation eliminiert werden. Sie lag in einem sehr empfindlichen Testsystem an der unteren Nachweisgrenze.

Es wurde weiter die Kettenlänge der Produkte der Poly(A)-Polymerase Reaktion bestimmt, wobei ein 10-facher Reaktionsansatz eingesetzt wurde (Endvolumen 2ml), der 120 Minuten bei 37°C inkubierte. Nach Isolierung und alkalischer Hydrolyse der Poly(A)-Kette wurde AMP von Adenosin durch Hochspannungs-Elektrophorese in 80mM Formiat-5mM EDTA-Puffer pH 3,5 getrennt (2500 Volt, 90 Minuten). Aus dem Verhältnis der Radioaktivität in AMP + Adenosin / Radioaktivität in Adenosin errechnet sich eine mittlere Kettenlänge von 8,3 AMP-Resten für das in vitro synthetisierte Poly(A).

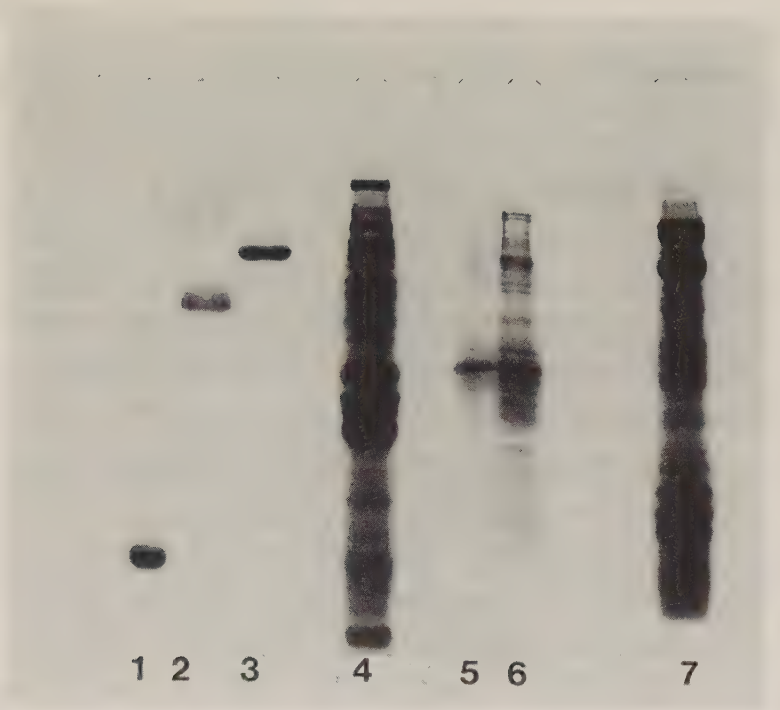

Abbildung 4: Gelelektrophorese von Poly(A)-Polymerase nach ATP-Sepharose-Chromatographie in 15% Polyacrylamid-SDS-Gelen. Aliquots (50µl) der Fraktionen in Abb.2 wurden mit Laemmli-Puffer (zweifach konzentriert) versetzt und eine Minute bei 90°C erhitzt. Nach rascher Abkühlung wurden die denaturierten Proteine auf ein Plattenengel aufgetragen. Die Laufzeit betrug 13 Stunden bei Zimmertemperatur. Die Spannung wurde konstant bei 50 Volt gehalten. Die Proteine im Gel wurden nach der Elektrophorese in 0,1% Amido-Schwarz-10% Essigsäure-40% Äthanol-Lösung über Nacht gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mittels einer 10% Essigsäure-40% Äthanol-Lösung.
1. Cytochrom C 2. Ovalbumin 3. Rinderserum Albumin 4. Fraktion 4 5. Fraktion 17 6. Pool aus Fraktionen 21, 22, 23 und 24 7. Fraktion 45 in Abb.2

3.2. Isolierung der Nukleotid-Polymerasen aus Ehrlich Ascites-zellkernen.

Um die nicht-transkriptive Synthese von Polyribonukleotiden in vivo und in vitro zu untersuchen, wurden Ehrlich Ascites-zellen als Ausgangsmaterial gewählt. Im Gegensatz zu Ratten-leber handelt es sich hierbei um eine homogene Zellpopula-tion, die auch experimentelle Versuchsanordnungen ermöglicht, in denen Kurzzeitmarkierungen mit radioaktiven Nukleosiden, Nukleosidanalogen und Inhibitoren der Transkription einge-setzt werden können. Als erstes wurden die Enzyme untersucht, die die DNA-unabhängige Synthese von Poly(A), Poly(U), Poly(C) und Poly(G) katalysieren. Nach Gelfiltration eines Ascites-zellkernextraktes auf Sephadex G-200 in Gegenwart von 0,4M NH_4Cl wurden drei Enzymaktivitäten festgestellt, die durch den Primer-abhängigen Einbau von AMP, UMP bzw. CMP im TCA-fällbaren Material nachgewiesen wurden. Im Gegensatz zu Kern-Extrakten aus Rattenleber ließ sich hier die Poly(G)-Polymera-se nur in sehr niedrigen Aktivitäten nachweisen, sodaß eine weitere Reinigung und Charakterisierung nicht möglich war. Um die Enzyme weiter zu reinigen, sollte nach der Gelfiltra-tion an Sephadex G-200 eine Ionenaustauscher-Chromatographie angeschlossen werden. Hierzu mußte die Salzkonzentration des zu trennenden Enzymextraktes vermindert werden. Es zeigte sich jedoch, daß die zu untersuchenden Enzyme bei einer niedri-geren Salzkonzentration als 0,2M NH_4Cl inaktiviert wurden. Unter diesen Bedingungen konnten die Nukleotid-Polymerasen (Poly(A)-, Poly(C)- und Poly(U)-Polymerase) an keinen der geprüften Ionenaustauscher gebunden werden (CM-Cellulose,

SP-Sephadex, Phosphocellulose und Hydroxyapatit). Es war wichtig, die Nukleotidpolymeraseaktivitäten von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase abzutrennen. Da bekannt war, daß die RNA-Polymerase erst zwischen 0,25 und 0,35M NH_4Cl von einer DEAE-Sephadex Säule eluiert, wurde dieser Ionenaustauscher in 0,2M Salzpuffer als zweiter Reinigungsschritt für die Nukleotid-Polymerasen angewandt. Die gesamte eingesetzte Enzymaktivität wurde in den durchlaufenden, ungebundenen Fraktionen der DEAE-Sephadex Säule wiedergefunden. In diesen Fraktionen wurde - im Vergleich zur Poly(A)-Polymeraseaktivität - nur 4,5% der RNA-Polymeraseaktivität und 6% einer Nukleosiddiphosphat-einbauenden Enzymaktivität festgestellt. Eine 4,2-fache Reinigung des Enzyms wurde durch Gelfiltration und DEAE-Sephadex Chromatographie erreicht.

3.2.1. Charakterisierung der Nukleotid-Polymerasen aus Ehrlich Asciteszellkernen.

3.2.1.1. Bestimmung des Molekulargewichts.

Das Molekulargewicht der Nukleotid-Polymerasen wurde mit Hilfe der Gelfiltration auf Sephadex G-200 ermittelt. Die Sephadex-Säule wurde mit Aldolase (M.G. 158.000), Rinderserum-Albumin (M.G. 67.000), Ovalbumin (M.G. 45.000) und Cytochrom C (M.G. 12.500) geeicht. Wie Abbildung 5 zeigt, treten Poly(A)-Polymerase, Poly(U)-Polymerase und Poly(C)-Polymerase aus der Sephadex G-200 Säule mit dem Elutionsvolumen aus, das dem von Ovalbumin entspricht (M.G. 45.000).

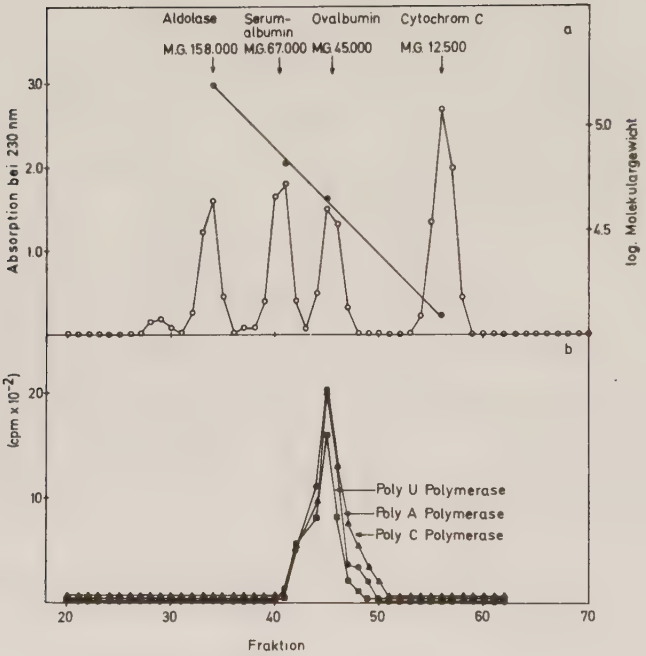

Abbildung 5:

Bestimmung des Molekulargewichts der Nukleotid-Polymerasen aus Ehrlich Asciteszellkernen durch Gelfiltration auf Sephadex G-200 Superfine. Ein Zellkernextrakt (2ml) in Puffer C wurde auf die Sephadex G-200-Säule (2x80cm) aufgetragen. Fraktionen von 2,2ml wurden gesammelt.

a) Marker-Proteine

b) Elutionsprofil der Nukleotid-Polymerasen

3.2.1.2. Ionen.

Der Einfluß von Mn^{++}- und Mg^{++}-Ionen auf die Nukleotid-Polymerase-Reaktion wurde untersucht. In Gegenwart von Mn^{++} erreicht die Enzymaktivität der Poly(A)-Polymerase ein Maximum bei 10mM. Für den Einbau von CTP und UTP liegt das entsprechende Maximum bei 5mM Mn^{++} (Abb.6). Die Polymerisierung von CMP betrug 10% und die von UMP 30% der von AMP. In Gegenwart von Mg^{++} wurde für die Poly(A)-Polymerase Aktivität ein Maximum bei 7,5mM festgestellt. Die Mg^{++}-abhängige Enzymaktivität entsprach 50% der in Anwesenheit von Mn^{++} erreichten Aktivität. In Gegenwart von Mg^{++} war nur ein sehr niedriger Einbau von UMP und CMP in Poly(U) bzw. Poly(C) zu beobachten (Abb.7).

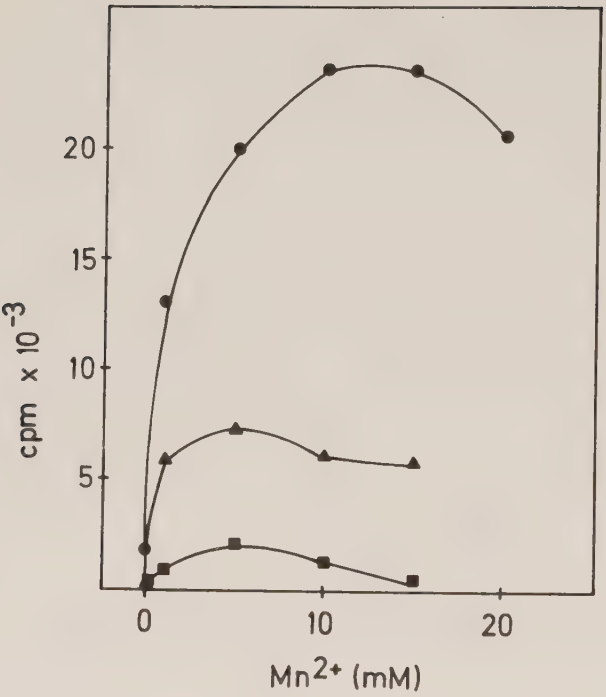

Abbildung 6:
Bestimmung der Mn^{++}-Abhängigkeit der Nukleotid-Polymerasen aus Ehrlich Asciteszellkernen. Aliquots (50µl) einer Enzym-Präparation nach Gelfiltration wurden in Gegenwart von verschiedenen Mn^{++}-Konzentrationen 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit einer 2%igen SDS-Lösung beendet und die Radioaktivität im TCA-fällbaren Material gemessen.

●——● Poly(A)-Polymerase
▲——▲ Poly(U)-Polymerase
■——■ Poly(C)-Polymerase

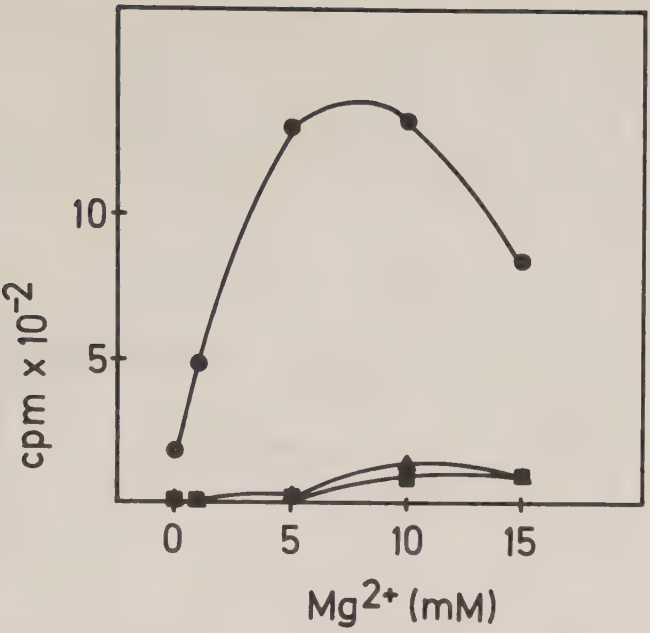

Abbildung 7:

Bestimmung der Mg^{++}-Abhängigkeit der Nukleotid-Polymerasen aus Ehrlich Asciteszellkernen. Die Inkubationsansätze wurden wie in Abb.6 beschrieben durchgeführt.

●——● Poly(A)-Polymerase
▲——▲ Poly(U)-Polymerase
■——■ Poly(C)-Polymerase

3.2.1.3. pH-Optimum.

Das pH-Optimum der Enzymaktivität wurde durch pH-Änderung des Tris-HCl-Puffers in den Inkubationsansätzen bestimmt. Wie Abb.8 zeigt, erreicht die Poly(A) Polymerase Aktivität ein Plateau zwischen pH 8,0 und pH 8,5. Routinemäßig wurde der pH der Puffer für die Enzym-Inkubationsansätze auf pH 8,4 eingestellt.

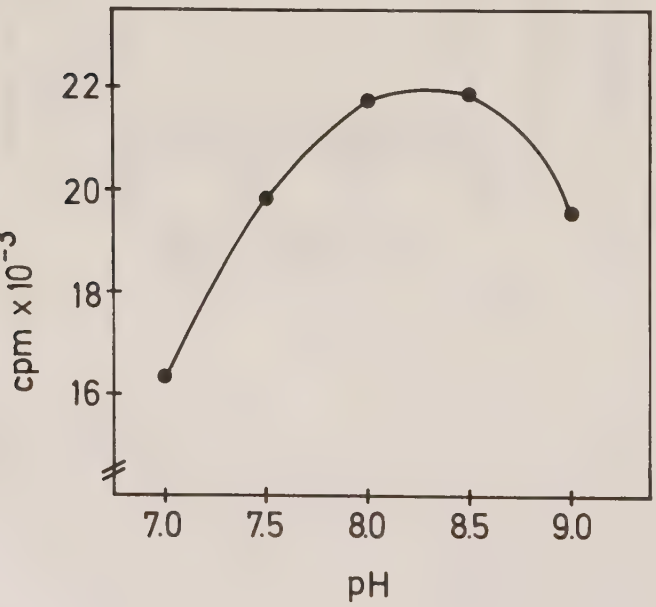

Abbildung 8:

pH-Abhängigkeit des Einbaus von AMP in Poly(A) durch Poly(A)-Polymerase aus Ehrlich Asziteszellkernen nach DEAE-Sephadex-Chromatographie.

3.2.1.4. Zeitkinetik und Charakterisierung des Produktes der Poly(A)-, Poly(U)- und Poly(C)-Polymerase Reaktion.

Der Einbau von AMP, UMP bzw. CMP in Poly(A), Poly(U) bzw. Poly(C) verlief bei einer Inkubationstemperatur von 37°C bis zu zwei Stunden linear (Abb.9).

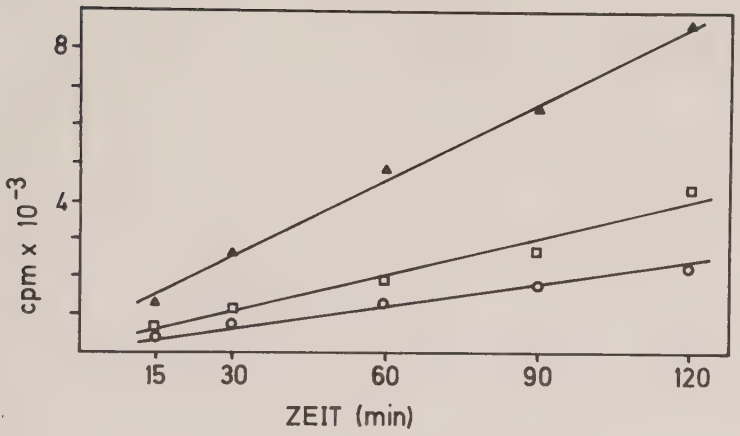

Abbildung 9:

Zeitabhängigkeit der Synthese von Ribonukleotid-Homopolymeren durch die Nukleotid-Polymerasen aus Ehrlich Asciteszellkernen.

△——△ Poly(A)-Polymerase
□——□ Poly(C)-Polymerase
○——○ Poly(U)-Polymerase

Nach einer 90 minütigen Inkubationszeit bei 37°C wurde die Anzahl der Nukleosidmonophosphate, die in jede Ribonukleotid-Homopolymerkette eingebaut wurde, bestimmt. Nach Isolierung und alkalischer Hydrolyse der Reaktionsprodukte wurden die Nukleotide und Nukleoside durch Hochspannungs-Elektrophorese voneinander getrennt. Die durchschnittliche Kettenlänge der verschiedenen Ribonukleotid-Homopolymere läßt sich aus dem Verhältnis cmp (in Nukleosiden + Nukleotiden) /cmp in Nukleosiden bestimmen. Dieses Verhältnis betrug für Poly(A) 13,5/1, für Poly(U) 4,5/1 und für die Poly(C)-Kette 4,4/1.

3.2.1.5. Primer-Spezifität.

Wegen der Existenz mehrerer verschiedener Nukleotid-Polymerase-Aktivitäten in den Kernen von Rattenleber und Ehrlich Asciteszellen stellte sich die Frage, ob die Polymerisierung der verschiedenen Nukleotide an jeweils spezifischen Primern stattfindet. Ergebnisse aus der Literatur deuten an, daß die Poly(A)-Polymerase aus verschiedenen Organismen in vitro keine definierte Primer-Spezifität besitzt (6). Alle drei Formen der Poly(A)-Polymerase aus Rattenleberzellkernen bevorzugen die Oligonukleotide $(Ap)_9A$ und in geringerem Maße mRNA als Primer (1). Die verschiedenen Enzyme besitzen jedoch eine unterschiedliche Fähigkeit, den gleichen Primer zu verwenden. Um die Primer-Spezifität der Nukleotid-Polymerasen aus Ehrlich Asciteszellkernen zu untersuchen, wurden die Inkubationsansätze in Gegenwart von verschiedenen Oligonukleotiden durchgeführt. Als Kontrolle wurde Kern-RNA aus Rattenleberzellen eingesetzt. Aus Tabelle 2 wird deutlich, daß von den getesteten Oligonuk-

leotiden nur $(Ap)_3A$ und $(Ap)_5A$ als Primer benutzt wurden und dieses ausschließlich von der Poly(A)-Polymerase. Das Fehlen eines AMP-Einbaus in Poly(A), wenn Poly(U) als Primer angeboten wurde, spricht gegen einen RNA-Transkriptions-Mechanismus (RNA-Replikase) für die Poly(A)-Synthese. Die Bevorzugung von $(Ap)_3A$ und $(Ap)_5A$ als Primer der Poly(A)-Polymerase Reaktion in vitro könnte auf die Funktion des Enzyms in vivo hinweisen, bereits vorhandene RNA-Poly(A)-Ketten zu elongieren.

Primer	Substrat		
	ATP	CTP	UTP
Kern-RNA	100	100	100
-RNA	0,0	0,0	18,8
$(Ap)_3A$	99,7	0,0	0,0
$(Ap)_5A$	66,2	0,0	0,0
$(Cp)_3C$	2,0	0,0	0,0
$(Cp)_5C$	1,0	0,0	0,0
$(Up)_3U$	1,7	0,6	3,4
$(Up)_5U$	2,8	1,2	1,7
Poly(U)	0,0	9,5	0,0

Tabelle 2: Primer-Abhängigkeit der Nukleotid-Polymerasen aus Ehrlich Asciteszellkernen (Prozent der Kontrolle).

3.2.1.6. Inhibitoren der Enzym-Reaktion.

Um den nicht-transkriptiven Charakter der Nukleotid-Polymerase-Reaktion zu überprüfen, wurden bekannte Inhibitoren des Transkriptionsprozesses wie Actinomycin D und α-Amanitin in den Inkubationsansätzen verwendet. Actinomycin D hemmt in vitro und in vivo mehr als 95% der RNA-Synthese bei einer Konzentration von 5µg/ml durch spezifische Bindung an die DNA-Matritze (7). α-Amanitin hemmt 100% der RNA-Polymerase B Aktivität bei einer Konzentration von 0,5µg/ml. RNA-Polymerase A ist nicht hemmbar und RNA-Polymerase C wird erst bei einer Konentration von 133 µg/ml α-Amanitin zu 100% gehemmt (8). Der Einfluß beider Inhibitoren auf die Aktivität der Nukleotid-Polymerasen wurde durch Bestimmung der Enzymaktivitäten nach Zugabe von α-Amanitin (0,5µg/ml) oder Actinomycin D (150µg/ml) zu den Inkubationsansätzen ermittelt. Mit Ausnahme einer 12,7%igen Hemmung der Poly(C)-Synthese durch α-Amanitin hatte keiner der beiden Inhibitoren einen Einfluß auf den Einbau von AMP, UMP bzw. CMP in die Poly(A)-, Poly(U)- bzw. Poly(C)-Kette (Tabelle 3).

Inhibitor	Substrat		
	% Hemmung		
	ATP	UTP	CTP
Actinomycin D	0,6	0,0	0,0
α-Amanitin	0,9	0,0	12,7

Tabelle 3: Einfluß von Inhibitoren der DNA-abhängigen RNA-Synthese auf die Nukleotid-Polymerase-Reaktion.

Cordycepintriphosphat (3' Desoxyadenosintriphosphat), ein ATP-Analoges, hemmt die Poly(A)-Polymerase Reaktion in vivo und in vitro (9,10,11,12,13,14).

Die Poly(A)-Polymerase Aktivität aus Rattenleberzellkernen wird durch Cordycepintriphosphat bzw. 2'Desoxyadenosintriphosphat, das physiologische Substrat für die DNA-Synthese, bis zu 90% bei einer Inhibitor-Konzentration von 100µM gehemmt (1). Die Nukleotid-Polymerasen aus Asciteszellkernen wurden durch 3'dATP bzw. 2'dATP im gleichen Maße wie die Poly(A)-Polymerase aus Rattenleberzellkernen gehemmt (Abb.10 und 11). Es ist postuliert worden, daß die Hemmung der Poly(A)-Polymerase durch 3'dATP kompetitiv zu ATP ist (15) und daß der Inhibitor nicht in die Poly(A)-Kette eingebaut wird (1). Die Hemmung der Poly(A)-Synthese in vitro durch 2'dATP erfolgt wahrscheinlich durch Bindung des Inhibitors an das Enzym selbst (1).

Die Hemmung der Poly(U)-Polymerase und Poly(C)-Polymerase (s. Abb.10 und 11) durch die ATP-Analogen könnte durch einen ähnlichen Mechanismus erklärt werden. Ebenso wurde die Synthese von Ribonukleotid-Homopolymeren durch die Anwesenheit der anderen nicht-markierten Nukleotide gehemmt (Tabelle 4). Diese Inhibierung könnte auf einer Bindung der Nukleotide an das Enzym mit nachfolgender Inaktivierung desselben beruhen oder auf der Synthese von Ribonukleotid-Copolymeren (s. Kap. 3.3.).

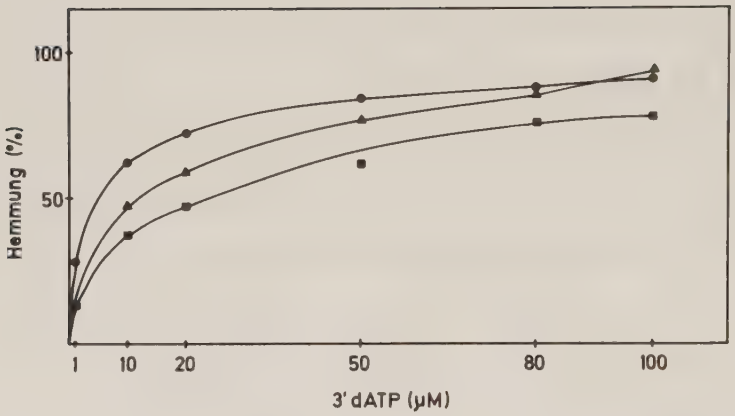

Abbildung 10:

Einfluß von Cordycepintriphosphat auf den Einbau von AMP, UMP bzw. CMP in Poly(A), Poly(U) bzw. Poly(C). Die Nukleotid-Polymerasen aus Ehrlich Asciteszellkernen wurden in Gegenwart von verschiedenen 3'dATP-Konzentrationen 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit einer 2%igen SDS-Lösung beendet und die Radioaktivität im TCA-fällbaren Material gemessen. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert von Duplikaten.

●—● Poly(A)-Polymerase
▲—▲ Poly(U)-Polymerase
■—■ Poly(C)-Polymerase

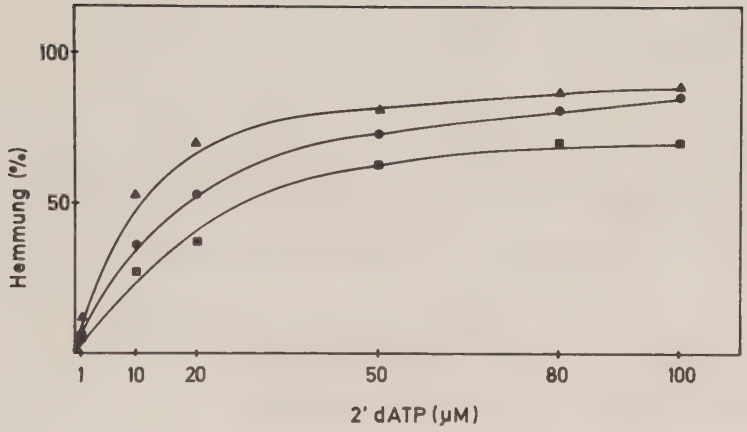

Abbildung 11:

Einfluß von 2' Desoxyadenosintriphosphat auf den Einbau von AMP, CMP bzw. UMP in Poly(A), Poly(C) bzw. Poly(U). Die Reaktionsansätze wurden wie in Abb.10 beschrieben durchgeführt.

●—● Poly(A)-Polymerase
▲—▲ Poly(U)-Polymerase
■—■ Poly(C)-Polymerase

Reaktionsansatz	cpm	% Hemmung
(^{3}H)-UTP	14.643	
(^{3}H)-UTP+ATP+CTP+GTP	1.040	92,9
(^{3}H)-CTP	11.039	
(^{3}H)-CTP+ATP+UTP+GTP	3.946	64,2
(^{3}H)-ATP	20.048	
(^{3}H)-ATP+CTP+UTP+GTP	3.451	82,8

Tabelle 4: Einfluß nicht-markierter Nukleosidtriphosphate (10^{-4}M) auf die Synthese von Ribonukleotid-Homopolymeren.

3.2.1.7. Poly(A)-Abbau durch Poly(A)-Polymerase.

Poly(A)-Polymerase katalysiert die Reaktion:

$$nATP \xrightarrow[Mn^{++}]{RNA} RNA\text{-}(pA)_n + nP\text{-}P$$

Es wurde die Möglichkeit untersucht, ob die Poly(A)-Polymerase die oben genannte Reaktion in beiden Richtungen katalysieren könnte, d.h. daß sowohl der Einbau von AMP in Poly(A) als auch der Abbau von Poly(A) durch die Poly(A)-Polymerase ausgeführt wird. Nach zwei Stunden Inkubationszeit unter Normalbedingungen wurde zu dem Inkubationsansatz Pyrophosphat mit einer Endkonzentration von 10^{-4}M hinzugefügt. Als Kontrolle wurde zu parallel laufenden Inkubationen EDTA und EDTA + Pyrophosphat zugesetzt, um die endogene Ribonuklease-Aktivität von Puffer und Enzymextrakt zu bestimmen. Wie Abbildung 12 zeigt, wurde kein Abbau der bereits vorhandenen Poly(A)-Ketten festgestellt. Im Gegenteil, der Einbau von AMP in Poly(A) in Gegenwart von Pyrophosphat verlief weiter linear bis zum Ende der Inkubationszeit.

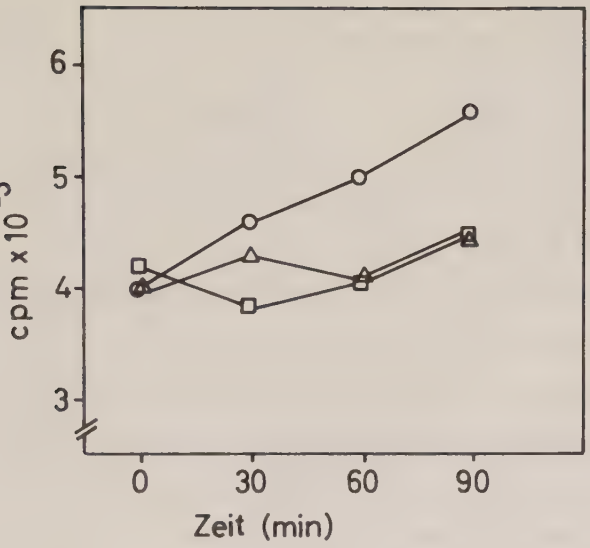

Abbildung 12:

Einfluß von Pyrophosphat auf den Einbau von AMP in Poly(A). Poly(A)-Polymerase aus Ehrlich Asciteszellkernen wurde zwei Stunden bei 37°C unter Synthesebedingungen inkubiert. Anschließend wurde zu verschiedenen Ansätzen EDTA (10mM), $Na_4P_2O_7 \cdot 10\ H_2O$ (10^{-4}M) und EDTA + $Na_4P_2O_7 \cdot 10\ H_2O$ hinzugefügt und die Reaktion weitere 90 Minuten durchgeführt. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und die Radioaktivität des TCA-fällbaren Materials gemessen.

○—○ $Na_4P_2O_7 \cdot 10\ H_2O$
△—△ EDTA
□—□ EDTA + $Na_4P_2O_7 \cdot 10\ H_2O$

3.3. Nichttranskriptive Synthese von Ribonukleotid-Copolymeren durch Nukleotid-Polymerasen aus Kernen von Rattenleberzellen und Ehrlich Asciteszellen.

Die Existenz von Poly(A)-, Poly(U)-, Poly(C)- und Poly(G)-Polymerasen nebeneinander in Zellkernen, die in vitro den Einbau von Nukleosidtriphosphaten in ihre entsprechenden Homopolymere katalysieren, wirft die Frage auf, ob die Synthese eines Ribonukleotid-Copolymers durch das Zusammenwirken dieser Enzymaktivitäten in vitro möglich ist.

Die nicht-transkriptive Synthese der Copolymere Poly(A:C) ist von Haff und Keller beschrieben worden. Poly(A)-Polymerase und Poly(C)-Polymerase aus Hefe wurden in Gegenwart von radioaktivem ATP und nicht-markiertem CTP zusammen inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden als (Poly(A:C) durch ihre Empfindlichkeit gegenüber Verdauung mit Ribonuklease A identifiziert (17).

Das Vorliegen eines Ribonukleotid-Copolymers, also einer Polynukleotidkette, in der alternierend die vier bekannten Nukleotide vorkommen, läßt sich durch die "nearest-neighbour" Sequenzanalyse nachweisen. Prinzip dieser Nachweisreaktion ist, daß in einem Inkubationsansatz neben Primer-RNA und Enzym die vier Nukleosidtriphosphate angeboten werden, von denen nur eines mit ^{32}P in der α-Position radioaktiv markiert ist. Durch die anschließende alkalische Hydrolyse des synthetisierten Produktes entstehen 2',3'-Nukleosidmonophosphate, dabei gelangt das ursprünglich 5'-ständige ^{32}P zu dem vorstehenden benachbarten Nukleotid (Abbildung 13). Durch

entsprechende Variationen in den Versuchsansätzen erhält man alle 16 möglichen Kombinationen der "nearest-neighbour" Positionen.

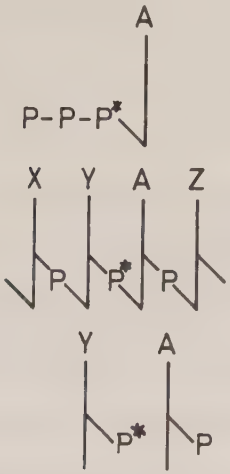

Abbildung 13:

"Nearest-neighbour" Sequenzanalyse.

Um die nicht-transkriptive Synthese von Ribonukleotid-Copolymeren nach der oben beschriebenen Methode zu untersuchen, wurden die Nukleotid-Polymerasen aus Rattenleberzellkernen und Asciteszellkernen mit jeweils einem ^{32}P-markierten Nukleosidtriphosphat in Gegenwart der anderen drei nicht-mar-

kierten Nukleotide in 10-fachen Reaktionsansätzen 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Daneben wurde die Verteilung der ^{32}P-Radioaktivität in den vier verschiedenen Ribonukleotid-Homopolymeren untersucht. Nach Isolierung und alkalischer Hydrolyse der Reaktionsprodukte wurden die Nukleosidmonophosphate mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie auf PEI-Cellulose-Platten getrennt (18). Die Platte wurde in 1cm breite Streifen geschnitten und die Radioaktivität in diesen Streifen gemessen. Der Ort jedes Nukleosidmonophosphates auf der PEI-Cellulose-Platte wurde im Vergleich zu der Wanderung von Nukleotid-Markern identifiziert. Die Inkubationsansätze wurden jeweils mit verschiedenen α-^{32}P-markierten Nukleosidtriphosphaten unter gleichen Bedingungen wiederholt. ^{32}P-markierte Phosphatgruppen konnten immer in allen vier Nukleosidmonophosphaten festgestellt werden (Tabellen 5 und 6).

Die Anzahl der in die Polymerkette eingebauten Nukleotide wurde durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Reaktionsprodukte unter denaturierenden Bedingungen (99% Formamid) nach der Methode von Pinder ermittelt (19). Es stellte sich heraus, daß zwischen 9 und 11 Nukleotide eingebaut worden waren (Abb.14). Da die Produkte der Enzymreaktion und der RNA-Primer zusammen in dem Gel laufen, ist auf eine kovalente Bindung zwischen Ribonukleotid-Copolymer und RNA-Primer zu schließen.

Reaktionsansatz	Verteilung der Radioaktivität (% der gesamten Radioaktivität) GMP	UMP	AMP	CMP
α-^{32}P-ATP	7,3	4,1	84,7	3,7
UTP+CTP+GTP+α-^{32}P-ATP	20,0	22,7	40,0	17,9
α-^{32}P-UTP	10,2	72,2	3,5	13,9
ATP+CTP+GTP+α-^{32}P-UTP	28,65	34,7	16,1	20,4
α-^{32}P-CTP	0,0	2,3	14,2	83,3
ATP+UTP+GTP+α-^{32}P-CTP	19,7	44,6	23,6	13,4
α-^{32}P-GTP	-	-	-	-
ATP+CTP+UTP+α-^{32}P-GTP	14,3	28,8	33,0	26,8

Tabelle 5: Verteilung der Radioaktivität (in Prozent der gesamten Radioaktivität) in den von Nukleotid-Polymerasen aus Rattenleberzellkernen synthetisierten Ribonukleotid-Copolymeren.

Aus den Analysen der Tabellen 5 und 6 können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

1. Wenn die Enzyminkubation in Gegenwart von nur einem Nukleosidtriphosphat (α-^{32}P-markiert) durchgeführt wurde, wurde eine Ribonukleotid-Homopolymerkette synthetisiert, die zwischen 5 und 6 Nukleotide lang war und kovalent an die RNA-Primer gebunden war. Die Kettenlänge errechnet sich aus dem Anteil der Radioaktivität in den Nukleotiden, die in dem Inkubationsansatz nicht vertreten waren. Das Vorkommen dieser Radioaktivität in den vom Inkubat ausgeschlossenen Nukleotiden erklärt sich durch die Wanderung des ^{32}P vom

ersten Nukleotid der neusynthetisierten Ribonukleotid-Homoplymerkette an das endständige Nukleotid der Primer-RNA nach alkalischer Hydrolyse (s. Abbildung 13).

	Verteilung der Radioaktivität (% der gesamten Radioaktivität)			
Reaktionsansatz	GMP	UMP	AMP	CMP
α-^{32}P-ATP	0,4	4,6	86,0	8,9
UTP+CTP+GTP+α-^{32}P-ATP	6,7	22,3	48,0	23,0
α-^{32}P-UTP	10,6	84,8	4,2	0,3
ATP+CTP+GTP+α-^{32}P-UTP	3,5	32,3	52,2	12,4
α-^{32}P-CTP	4,7	6,0	5,8	83,4
ATP+UTP+GTP+α-^{32}P-CTP	2,6	14,6	34,5	48,1
α-^{32}P-GTP	-	-	-	-
ATP+UTP+CTP+α-^{32}P-GTP	8,35	34,0	41,5	13,7

Tabelle 6: Verteilung der Radioaktivität (in Prozent der gesamten Radioaktivität) in den von Nukleotid-Polymerasen aus Asciteszellkernen synthetisierten Ribonukleotid-Copolymeren.

2. In Anwesenheit der vier Nukleosidtriphosphate, von denen jeweils eines α-^{32}P-markiert war, wurde von den Nukleotid-Polymerasen ein Ribonukleotid-Copolymer (RNA-Molekül) gebaut, das zwischen 9 und 11 Nukleotide lang und kovalent an den RNA-Primer gebunden war (s. Abbildung 14).

3. Die "nearest-neighbour" Sequenzanalyse des Ribonukleotid-Copolymers das von Nukleotid-Polymerasen aus Rattenleberzell-

kernen synthetisiert worden ist, zeigt einen hohen Anteil der Radioaktivität in AMP, wenn neben den drei anderen nichtmarkierten Nukleotiden entweder α-^{32}P-ATP oder α-^{32}P-GTP in die Enzyminkubation eingesetzt wurde. Unter den gleichen Bedingungen wurde UMP preferentiell markiert, wenn α-^{32}P-UTP bzw. α-^{32}P-CTP eingesetzt worden war. Aus diesen beiden Tatsachen könnte geschlossen werden, daß die nicht-transkriptive Synthese eines Ribonukleotid-Copolymers durch die Nukleotid-Polymerasen nicht ein Zufallsprozeß ist, sondern eine kontrollierte Reaktion, bei der die Sequenzen ..(AnA)n.., ..(ApG)n.., ..(UpU)n.. und ..(UpC)n.. häufiger als andere mögliche Kombinationen in der Ribonukleotid-Copolymerkette vorkommen.

4. Die Analyse der Radioaktivitäts-Verteilung in dem von Nukleotid-Polymerasen aus Ehrlich Asciteszellkernen synthetisierten Ribonukleotid-Copolymer zeigt, daß AMP am häufigsten in die Ribonukleotid-Copolymerkette eingebaut wird. Das ist vielleicht durch die hohe Enzymaktivität der Poly(A)-Polymerase zu erklären, wie unter 3.2.1.2. gezeigt wurde.

Der Anteil der Radioaktivität in jedem Nukleosidmonophosphat nach ihrer Trennung auf PEI-Cellulose-Platten könnte teilweise durch ebenfalls markierte Nachbarnukleotide kontaminiert sein, da die Orte von CMP, AMP und UMP auf der PEI-Cellulose-Platte ziemlich nahe beieinander lagen. Um dieses Kontaminationsproblem zu untersuchen, wurden Reaktionsansätze mit 10-fachen Volumen in Gegenwart der vier Nukleosidtriphosphate, wovon jeweils eines (^{3}H)-markiert war, 120 Minuten bei 37^{o}C inkubiert. Nach Analyse der Reaktionsprodukte auf PEI-

Cellulose-Platten sollte die (^{3}H)-Radioaktivität nur in dem Monophosphat-Derivat desjenigen (^{3}H)-markierten Nukleosidtriphosphats zu finden sein, das in der Inkubationsmischung eingesetzt worden war.

In der Tat wurden mehr als 94% der gesamten Radioaktivität in AMP wiedergefunden, wenn sich (^{3}H)-ATP als markiertes Nukleosidtriphosphat in dem Inkubationsansatz befand. Dennoch wurden 27,4% bzw. 29,6% an Kontamination von AMP durch CMP bzw. UMP festgestellt, wenn (^{3}H)-CTP bzw. (^{3}H)-UTP zu dem Inkubationsansatz gegeben wurde. Eine zweite Kontaminationsquelle bei der Analyse der Zusammensetzung des Ribonukleotid-Copolymers ist von dem letzten Nukleotid des RNA-Primer-Moleküls zu erwarten. Bei einer "nearest-neighbour" Sequenzanalyse der Reaktionsprodukte der Nukleotid-Polymerasen wird das letzte Nukleotid des Primer-Moleküls (^{32}P)-markiert und deswegen als enzymatisch eingebautes Nukleotid bei der Sequenzanalyse identifiziert. Dieser Kontaminationsanteil wurde aus der Sequenzanalyse derjeniger Produkte ermittelt, die in Gegenwart von nur einem Nukleosidtriphosphat (α-^{32}P-markiert) synthetisiert wurden (Tabelle 5 und 6). Es stellte sich heraus, daß diese Kontamination durchschnittlich 4% der gesamten eingebauten Radioaktivität des Ribonukleotid-Copolymers betrug. Beide Kontaminationsanteile in den Nukleosidmonophosphaten sind in den Ergebnissen berücksichtigt worden.

Neben der Bestimmung der Kettenlänge des Ribonukleotid-Copolymers durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden diese auch aus einer Endgruppenanalyse ermittelt. Nukleotid-

Polymerasen aus Ehrlich Asciteszellkernen wurden in Gegenwart von drei Nukleosidtriphosphaten (eines davon α-^{32}P-markiert) 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch eine "nearest-neighbour" Sequenzanalyse der Reaktionsprodukte wurde der Radioaktivitätsanteil der gesamten Radioaktivität bestimmt, welche dasjenige Nukleotid aufwies, das von dem Reaktionsansatz ausgeschlossen worden war (letztes Nukleotid der RNA-Primers). Dieses Nukleosidmonophosphat wurde als Endgruppen-Nukleotid betrachtet und aus seinem Anteil an der gesamten Radioaktivität die Kettenlänge des Ribonukleotid-Copolymers ermittelt (Tabelle 7). In Anwesenheit von ATP wurden um vier Nukleotide längere Ribonukleotid-Copolymerketten synthetisiert als in den Inkubationen, in denen ATP nicht vertreten war. Dieses Ergebnis läßt sich durch die relativ hohe Poly(A)-Polymeraseaktivität in Enzympräparationen aus Asciteszellkernen erklären.

	Verteilung der Radioaktivität (% der gesamten Radioaktivität)				
Reaktionsansatz	GMP	UMP	AMP	CMP	Kettenlänge
α-^{32}P-UTP+CTP+GTP	15,1	33,2	11,8	39,7	8,4
α-^{32}P-GTP +ATP+CTP	11,4	8,0	70,6	9,7	12,5

Tabelle 7: Verteilung der Radioaktivität (in Prozent der gesamten Radioaktivität) in dem von Nukleotid-Polymerasen aus Asciteszellkernen synthetisierten Ribonukleotid-Copolymer.

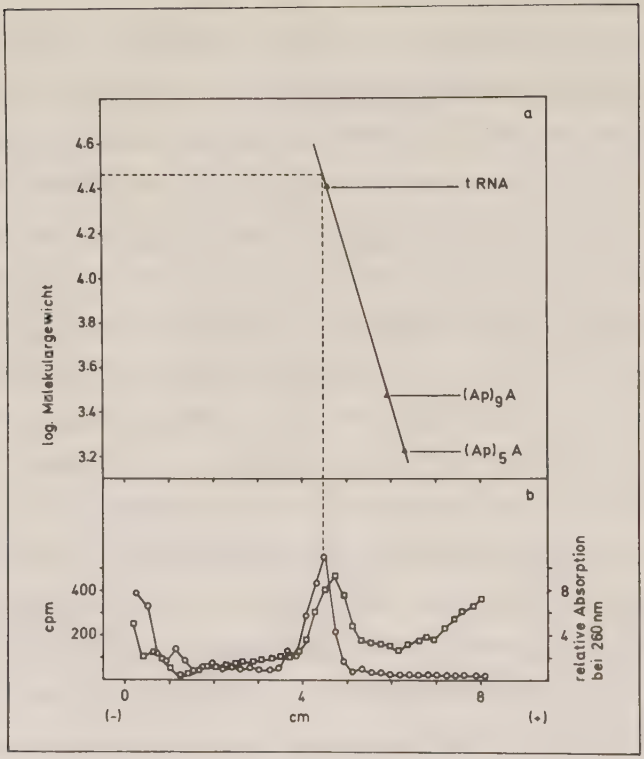

Abbildung 14: Bestimmung der Kettenlänge des Ribonukleotid-Copolymers durch Gelelektrophorese in 15% Polyacrylamid-Gelen unter denaturierenden Bedingungen (99% Formamid). Die Nukleotid-Polymerasen aus Ascites Zellkernen wurden in Gegenwart der vier Nukleosidtriphosphate ((^{3}H)-markiert) 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Primer wurde tRNA aus E.coli eingesetzt. Die Reaktion wurde mit 20µl einer 2%igen SDS-Lösung beendet und die Produkte der Reaktion wie in Tabelle 5 beschrieben isoliert. Nach Gelfiltration auf Sephadex G-50 und Äthanol-Fällung wurde das tRNA-Copolymer-Pellet in 0,02M Barbital-90% Formamid-Puffer pH 9,0 aufgenommen und auf die Polyacrylamid-Gele aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde in 99% Formamid 6 Stunden bei Zimmertemperatur durchgeführt (2 mA/Gel). Die Gele wurden mit den Oligonukleotiden $(Ap)_5A$, $(Ap)_9A$ und tRNA (77 Nukleotide lang), die zu parallel laufenden Gelen zugegeben worden waren, geeicht.
a) Eichung des Polyacrylamid-Gels.
b) Radioaktivitätsprofil des tRNA-Copolymer-Moleküls in dem Polyacrylamid-Gel. Das Gel (1x10cm) wurde in 2,1mm breite Scheiben geschnitten und in 0,5ml NCS + 0,1ml 4M NH_3 + 5ml T-Fluor über Nacht gelöst. Die Radioaktivität pro Scheibe wurde mit Hilfe eines LKB-Szintillationszählers gemessen.
o—o Radioaktivitätsprofil
□—□ UV-Profil des tRNA-Primer-Moleküls nach Inkubation ohne Nukleosidtriphosphate. Das UV-Profil des Gels wurde bei 260nm mit Hilfe eines Gilford-Spektrophotometers aufgenommen.

3.4. Untersuchung der nicht-transkriptiven Synthese von Polyribonukleotiden *in vivo*.

Im Zellkern wird die genetische Information, die in der DNA gespeichert ist, durch die RNA-Polymerase in eine Population von RNA-Molekülen transkribiert, die unterschiedliche Größe, Halbwertszeit und Basen-Sequenzen haben. Einige der Produkte der Transkription durch die RNA-Polymerase B (hnRNA) wandern nach ihrer Prozessierung zu mRNA in das Cytoplasma, wo sie bei der Proteinsynthese die Aminosäuresequenz bestimmt. Die Prozessierung der hnRNA läuft wahrscheinlich in mehreren Etappen ab: 1. Verlängerung des 3' OH-Endes mit einer Poly(A)-Kette, die 200-250 Nukleotide lang ist (0,7-0,8% der Sequenzen der hnRNA). 2. Herabsetzung der Größe der hnRNA durch Spaltung bestimmter Sequenzen. 3. Modifizierung des 5' Endes durch Guanosin-7-Methyltransferase mit Bildung der Cap-Struktur (20).

Der niedrige Anteil der nicht-transkriptiv synthetisierten Sequenzen (z.B. Poly(A)) in der hnRNA macht es notwendig, den Transkriptions-Prozeß zu hemmen, um die nicht-transkriptive Synthese von Polyribonukleotiden *in vivo* untersuchen zu können. Zu diesem Zweck wurde Actinomycin D verwendet, eine Substanz, die *in vivo* bei Konzentrationen von 1-5µg/ml mehr als 95% der DNA-abhängigen RNA-Synthese hemmt (21).

3.4.1. Einfluß von Actinomycin D auf die RNA-Synthese in Ehrlich Asciteszellen.

Ehrlich Asciteszellen inkorporieren (^{3}H)-Uridin in die Kern-

RNA linear bis zu 75 Minuten bei einer Inkubationstemperatur von 37°C. Nach Zugabe von Actinomycin D zu den Zellsuspensionen wurde 93% der RNA-Synthese bei einer Inhibitor-Konzentration von 5µg/ml nach 3 Minuten Inkubationszeit gehemmt (Abb.15 und 16). Da Actinomycin D nur 93% der RNA-Synthese hemmt, wurde die Actinomycin D-resistente RNA-Synthese auf ihren nicht-transkriptiven Charakter untersucht. Bei einer Analyse der nicht-transkriptiven Synthese von Polyribonukleotiden in Gegenwart von Inhibitoren des Transkriptions-Prozesses muß berücksichtigt werden, daß die RNA-Konzentration bei längerer Einwirkung der Inhibitoren stark absinkt und damit als Primer-RNA nicht mehr zur Verfügung steht. So ist z.B. die Poly(A)-Synthese nur noch innerhalb der ersten Minuten nach Blockierung der Transkription nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde die Inkubationszeit von Ehrlich Asciteszellen in Gegenwart von Actinomycin D auf zwei Minuten beschränkt und gleichzeitig die Inhibitor-Konzentration auf 10µg/ml erhöht, um eine vollständige Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Synthese zu erhalten. Um neben der Blockierung der Transkription auch eine zusätzliche Hemmung der Poly(A)-Synthese zu erreichen, wurde in weiteren Ansätzen außer Actinomycin D auch das adenosinanaloge Cordycepin (3' Desoxyadenosin, ein weitgehend spezifischer Inhibitor der Poly(A)-Synthese) eingesetzt. Daneben wurde der Einfluß von 2' Desoxyadenosin auf die RNA-Synthese des Zellkerns untersucht. Ehrlich Asciteszellen wurden in Gegenwart von Actinomycin D + Cordycepin (50µg/ml) bzw. 2' Desoxyadenosin (50µg/ml) zwei Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Inkubationsende wurde die RNA

aus den Zellkernen extrahiert und ihre TCA-fällbare Radioaktivität und Konzentration bestimmt.

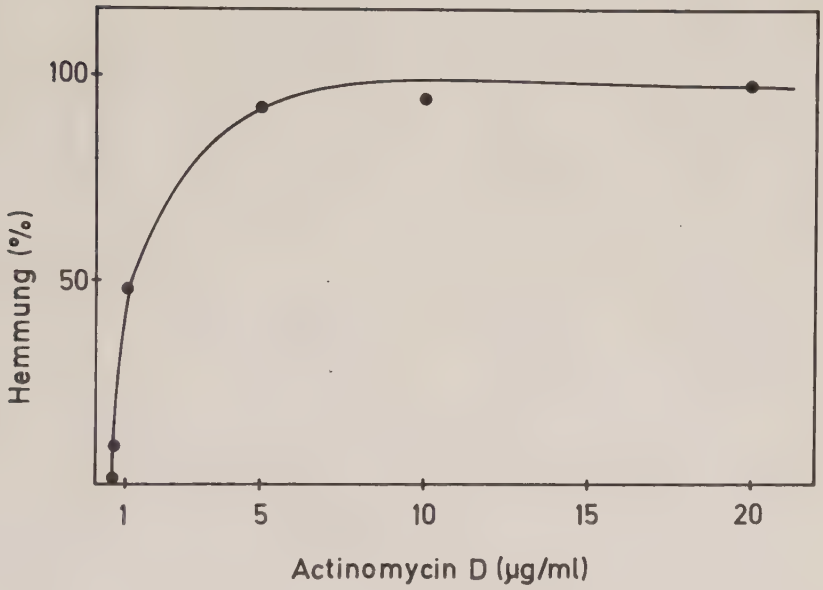

Abbildung 15:

Einfluß von Actinomycin D auf die RNA-Synthese in Ehrlich Asciteszellen.
Asciteszellen ($17{,}2 \times 10^5$/ml) wurden 5 Minuten mit verschiedenen Actinomycin D Konzentrationen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellkultur für 15 Minuten mit 10µCi/ml (^{3}H)-Uridin markiert. Die Kern-RNA wurde extrahiert und die Radioaktivität im TCA-fällbaren Material bestimmt. Der Einfluß von Actinomycin D ist als Prozent-Hemmung der Kern-RNA-Synthese gegenüber der RNA-Synthese in unbehandelten Zellen ausgewertet.

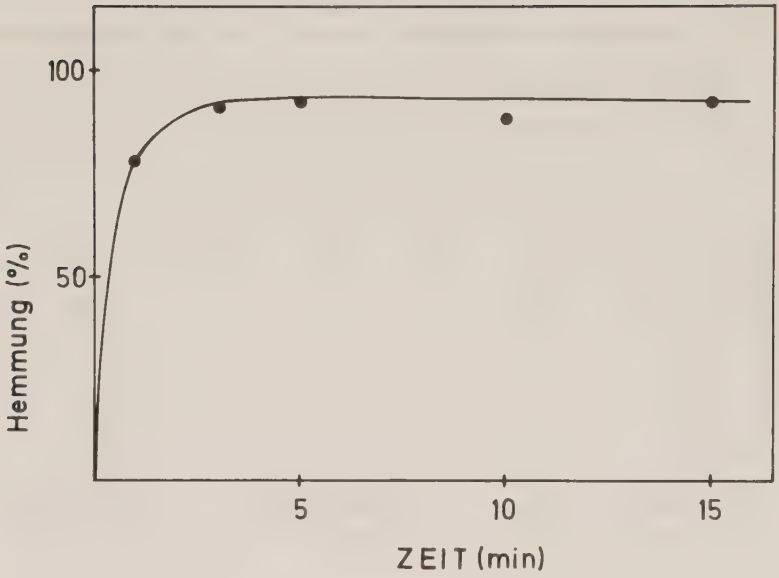

Abbildung 16:

Zeitkinetik der RNA-Synthese in Ehrlich Asciteszellen unter dem Einfluß von Actinomycin D.
Asciteszellen ($10x10^5$/ml) wurden in Gegenwart von Actinomycin D (5µg/ml) für verschiedene Zeiten inkubiert. Nach Actinomycin D Behandlung wurden 10µCi/ml (^3H)-Uridin zu der Zellkultur hinzugefügt und die Zellinkubation weitere zwei Minuten fortgesetzt. Die Kern-RNA wurde isoliert und die eingebaute Radioaktivität wie in Abb.14 beschrieben ausgewertet.

Tabelle 8 stellt die Ergebnisse dieses Experiments dar:

Zellbehandlung	cpm/mg Kern-RNA	% Hemmung
Kontrolle + (^{3}H)-Uridin	135.652	-
Kontrolle + (^{3}H)-Adenosin	703.046	-
Actinomycin D + (^{3}H)-Uridin	10.965	92,0
Actinomycin D + (^{3}H)-Adenosin	74.246	89,5
Actinomycin D + Cordycepin + (^{3}H)-Uridin	6.269	95,4
Actinomycin D + Cordycepin + (^{3}H)-Adenosin	35.152	95,0
Actinomycin D + 2' Desoxyadenosin + (^{3}H)-Uridin	6.547	95,2
Actinomycin D + 2' Desoxyadenosin + (^{3}H)-Adenosin	28.656	96,0

Die Zugabe von Cordycepin bzw. 2' Desoxyadenosin gemeinsam mit Actinomycin D zu einer Asciteszellkultur hat eine Zunahme der Hemmung der RNA-Synthese zur Folge im Vergleich zu der RNA-Synthese in Zellen, die nur mit Actinomycin D behandelt worden waren.

In (^{3}H)-Adenosin-markierten Zellen könnte die Zunahme der Inhibition der RNA-Synthese auf einer Hemmung der Poly(A)-Synthese durch Cordycepin bzw. 2' Desoxyadenosin beruhen. In diesem Fall könnte die Hemmung der RNA-Synthese durch zwei Effekte erklärt werden: 1. Hemmung der DNA-abhängigen RNA-

Synthese durch Actinomycin D und 2. Hemmung der DNA-unabhängigen Synthese der Poly(A)-Kette durch Cordycepin bzw. 2' Desoxyadenosin.

Da Cordycepintriphosphat in vitro die nicht-transkriptive Synthese von Poly(U) hemmt (3.2.1.5.), könnte der Einfluß von Cordycepin auf die Actinomycin D-resistente RNA-Synthese in Asciteszellen, die mit (^{3}H)-Uridin markiert wurden, auf eine nicht-transkriptive Synthese der in der hnRNA vorkommenden Oligo(U)-Sequenzen in vivo hinweisen (22).

Da bekannt ist, daß Cordycepin in geringem Maße die hnRNA-Synthese in HeLa-Zellen hemmt (14), wurde die Möglichkeit einer nicht-transkriptiven Synthese von Oligo(U)-Sequenzen im Zellkern und der Einfluß von Cordycepin bzw. 2' Desoxyadenosin auf die Kern-RNA-Synthese in Asciteszellen untersucht.

3.4.2. Oligo(U)-Sequenzen in Kern-RNA aus Ehrlich Asciteszellen: Transkriptive oder nicht-transkriptive Synthese?

In der hnRNA aus HeLa-Zellen sind neben der Poly(A)-Kette zwei kurze Ribohomopolymerketten vorhanden. Eine davon ist eine Oligo(A)-Sequenz, die etwa 25 AMP-Reste umfaßt und die in einem transkriptiven Prozeß synthetisiert wird. Die andere wird von einer Oligo(U)-Sequenz gebildet, die etwa 30-40 Nukleotide lang ist und nahe dem 5' Ende der hnRNA nachzuweisen ist (23 und 24). Mehr als 66% der Oligo(U)-Sequenzen sind in nicht-Poly(A)-haltiger RNA (Poly(A)$^{-}$-RNA) vorhanden (6).

Der Anteil an Oligo(U)-Sequenzen in Poly(A)$^+$-RNA und Poly(A)$^-$-RNA aus Asciteszellkernen wurde untersucht, indem die gesamte Kern-RNA nach 2 minütiger (^{3}H)-Uridin-Markierung extrahiert wurde und in Poly(A)$^+$-RNA und Poly(A)$^-$-RNA an Oligo(dT)-Cellulose getrennt wurde. Zum Nachweis der Oligo(U)-Sequenzen wurde jede RNA-Fraktion anschließend gegen Poly(A) hybridisiert (Bildung von Oligo(U) · Poly(A) Hybriden) und der nicht-hybridisierte Anteil der RNA mit Ribonuklease A und Ribonuklease T_1 verdaut. Durch Filtration auf Millipore Filtern wurden die Oligo(U)·Poly(A) Hybride selektiv zurückgehalten und ihre Radioaktivität bestimmt. Von den hybridisierten Oligo(U)-Sequenzen waren ca. 73% in Poly(A)$^-$-RNA und 20% in Poly(A)$^+$-RNA nachzuweisen. Um die Frage der nicht-transkriptiven Synthese der Oligo(U)-Sequenzen weiter zu untersuchen, wurde zunächst als methodische Kontrolle die nicht-transkriptive Synthese der Poly(A)-Kette in Asciteszellen nachgewiesen. Ehrlich Asciteszellen wurden zwei Minuten mit Actinomycin D (10µg/ml) behandelt und anschließend für 2-5 Minuten mit (^{3}H)-Adenosin markiert, wobei die Hemmung der de novo Synthese der Poly(A)-Kette bestimmt wurde. Die Kern-RNA wurde extrahiert und die Radioaktivität in der gesamten Kern-RNA und in der Poly(A)-Kette bestimmt (Tabelle 9).

Da Actinomycin D spezifisch die DNA-abhängige RNA-Synthese blockiert, wird der nicht-transkriptive Charakter der Poly(A)-Synthese aus dem Vergleich der Hemmung der Poly(A)-Synthese nach Actinomycin D-Behandlung und der Hemmung der gesamten Kern-RNA-Synthese deutlich. Die relativ starke Hemmung der Poly(A)-Synthese läßt sich mit dem Mangel an hnRNA-Primer

nach Inhibierung der Transkription erklären.

		Kern-RNA		Poly(A)	
Zellbehandlung	Markierungs-zeit (min)	cpm	% Hemmung	cpm	% Hemmung
Kontrolle		19.400		5.200	
Actinomycin D	2	2.100	89,2	1.050	79,8
Kontrolle		50.500		12.900	
Actinomycin D	4	2.500	95,1	2.600	79,9
Kontrolle		72.400		15.400	
Actinomycin D	5	4.800	93,4	5.100	66,0

Tabelle 9: Hemmung der Kern-RNA-Synthese und der Poly(A)-Synthese durch Actinomycin D nach verschiedenen Markierungszeiten.

Analysen der Oligo(U)-Sequenzen in der Kern-RNA wurden auf ähnliche Weise durchgeführt. Asciteszellen wurden nach zweiminütiger Behandlung mit Actinomycin D mit (^{3}H)-Uridin für 2-5 Minuten markiert. Die Kern-RNA wurde extrahiert und gegen Poly(A) hybridisiert. Die nicht-hybridisierten Sequenzen wurden mit 2,5 µg/ml Ribonuklease A und 5 Einheiten/ml Ribonuklease T_1 30 Minuten bei 37°C verdaut. Die Hybride wurden anschließend auf Glas-Filtern gesammelt und ihre Radioaktivität gemessen (Tabelle 10).

Actinomycin D hemmt die Oligo(U)-Synthese noch stärker als die gesamte Kern-RNA-Synthese. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Oligo(U)-Sequenzen in Ehrlich Asciteszellkernen im Verlauf eines DNA-abhängigen Prozesses synthetisiert werden.

Zellbehandlung	Markierungs-zeit (min)	Kern-RNA cpm	Kern-RNA % Hemmung	Oligo(U) cpm	Oligo(U) % Hemmung
Kontrolle		41.900		5.900	
Actinomycin D	2	10.700	75	127	97,9
Kontrolle		168.800		32.200	
Actinomycin D	4	16.900	90	574	98,3
Kontrolle		547.200		6.900	
Actinomycin D	5	30.800	94,4	240	96,6

Tabelle 10: Hemmung der Kern-RNA-Synthese und der Oligo(U)-Synthese durch Actinomycin D nach verschiedenen Markierungszeiten.

3.4.3. Einfluß von 3' Desoxyadenosin bzw. 2' Desoxyadenosin auf die RNA- und Poly(A)-Synthese in vivo.

3' Desoxyadenosintriphosphat (3' dATP) und 2' Desoxyadenosintriphosphat (2' dATP) hemmen in vitro 93% der Poly(A)-Polymerase-Aktivität bei einer Inhibitor-Konzentration von 100µM (3.2.1.6.). Untersuchungen über die RNA-Polymerase-Aktivität aus Ehrlich Asciteszellen in vitro, in Gegenwart von Cordycepintriphosphat, zeigten eine ebenso starke Hemmung der RNA-Polymerase wie diese für die Poly(A)-Polymerase beobachtet worden war (25). Ähnliche Hemmungen der Polymerase-Aktivitäten sind für die RNA-Polymerase aus HeLa-Zellen und Hefe beobachtet worden. In beiden Fällen wurde die RNA-Polymerase stärker als das entsprechende Poly(A) Polymerase Enzym gehemmt. 96% der RNA-Polymerase aus HeLa-Zellen wurden bei einer

3' dATP-Konzentration von 0,1mM gehemmt. Demgegenüber wurde nur 24% der Poly(A)-Polymerase-Aktivität bei einer Inhibitor-Konzentration von 0,2mM gehemmt. 2' dATP hatte in vitro keinen Einfluß auf die Aktivität der RNA-Polymerasen aus Hefe oder HeLa-Zellen. Aufgrund dieser bevorzugten Hemmung der RNA-Polymerase-Aktivität in vitro durch 3' dATP wurde postuliert, daß Cordycepin in vivo spezifisch die RNA-Synthese und mit einem sekundären Effekt auch die Poly(A)-Synthese hemmt (9 und 10).

Der Einfluß von Cordycepin bzw. 2' Desoxyadenosin auf die RNA- und Poly(A)-Synthese wurde in vivo untersucht, wobei der Einbau von radioaktiv markierten Nukleotiden in RNA und Poly(A), in Gegenwart der Inhibitoren, bestimmt wurde. Ehrlich Asciteszellen wurden zwei Minuten in Gegenwart von Cordycepin bzw. 2' Desoxyadenosin (50µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde die Zellkultur mit (^{3}H)-Uridin oder (^{3}H)-Adenosin markiert und die Inkubation für weitere zwei Minuten fortgesetzt. Nach Zugabe von eiskaltem Puffer (0,14M NaCl-10mM Tris-HCl pH 7,4) zu den Zellsuspensionen wurde die Kern-RNA extrahiert und der Einbau von markierten Nukleotiden in RNA und Poly(A) bestimmt.

Die gesamte Inkubationszeit wurde auf vier Minuten beschränkt, um zu gewährleisten, daß über die gesamte Inkubationszeit hinweg für die nicht-transkriptive Polynukleotid-Synthese Kern-RNA als Primer der Reaktion vorhanden war (3.4.2.). Die Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Synthese konnte durch (^{3}H)-Uridin-Markierung verfolgt werden. Demgegenüber wird (^{3}H)-Adenosin sowohl in die gesamte Kern-RNA als auch in die Poly(A)-

Kette eingebaut. Der Vergleich der unter hemmenden Bedingungen in RNA bzw. RNA und Poly(A) eingebauten markierten Nukleotide macht es also möglich, den Einfluß von Cordycepin bzw. 2' Desoxyadenosin auf die Poly(A)-Synthese in vivo zu erkennen.

Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse dieses Experiments:

Zellbehandlung		cpm/mg RNA	% Hemmung
Kontrolle	+ (^{3}H)-Uridin	130.208	
Kontrolle	+ (^{3}H)-Adenosin	868.814	
Cordycepin	+ (^{3}H)-Uridin	59.420	54,4
Cordycepin	+ (^{3}H)-Adenosin	368.159	57,6
2' Desoxyad.	+ (^{3}H)-Uridin	37.659	71,1
2' Desoxyad.	+ (^{3}H)-Adenosin	179.287	79,4

Aus dem Vergleich des Inhibitionsgrades der RNA-Synthese ((^{3}H)-Uridin-Markierung) und der RNA-Synthese + Poly(A)-Synthese ((^{3}H-Adenosin-Markierung) ist zu entnehmen, daß Cordycepin in vivo sowohl die RNA-Synthese als auch die Poly(A)-Synthese hemmt. Die ausgeprägte Hemmung (71-79%) der RNA-Synthese durch 2' Desoxyadenosin war zunächst ein unerwarteter Befund, da es sich hierbei um ein Nukleosid handelt, das in seiner phosphorylierten Form, z.B. zu Beginn der DNA-Synthese, in der Zelle in relativ hohen Konzentrationen anzutreffen ist. Aus diesem Grund befaßten sich die nachfolgenden Versuche mit der Frage, ob 2' Desoxyadenosin die beobachtete Hemmung der RNA-Synthese eventuell über eine Hemmung der Aufnahme von radioaktiven Nukleosiden aus dem Inkubationsmedium in die Zelle wirkt. Eine Veränderung des intrazellu-

lären Nukleotid-Pools durch 2' Desoxyadenosin schien weniger wahrscheinlich, da der Einbau von (^{3}H)-Uridin und (^{3}H)-Adenosin gleichermaßen gehemmt war. Der folgende Versuchsansatz geht von der Annahme aus, daß 2' Desoxyadenosin die Aufnahme der radioaktiven Nukleoside in die Zelle hemmt und damit auch weitgehend ihren Einbau in die RNA verhindert. Diese Barriere sollte hingegen nicht für (^{32}P)-Orthophosphat bestehen, das erst nach der Aufnahme in die Zelle in die vier Nukleotide eingebaut wird. Ein nach diesen Überlegungen durchgeführter Versuch zeigt (Abb.17), daß (^{32}P)-Orthophosphat in Anwesenheit von 2' Desoxyadenosin offenbar ungehindert in die Zelle gelangt und in gleichem Maße in die Kern-RNA eingebaut wird wie im entsprechenden Kontrollinkubat. Dieser Befund spricht für die Annahme, daß 2' Desoxyadenosin die Aufnahme von Adenosin und Uridin in die Zelle hemmt. Andererseits bewirkt 3' Desoxyadenosin (Cordycepin) eine Hemmung des Einbaus von Radioaktivität in die Kern-RNA unabhängig von der Art der Markierung; dies kann nur durch eine direkte Hemmung der RNA-Synthese erklärt werden.

Die Analyse mit 15-30% Sucrose-Gradienten der (^{32}P)-RNA, die in Gegenwart von Cordycepin bzw. 2' Desoxyadenosin synthetisiert wurden, bestätigten diese Befunde. Wie Abbildung 18 zeigt, gibt es keinen Unterschied zwischen dem RNA-Profil der Kontrolle und dem Profil der RNA, die aus 2' Desoxyadenosin-behandelten Zellen extrahiert wurde. Demgegenüber ist eine deutliche Hemmung der RNA-Synthese durch Cordycepin zu beobachten. Cordycepin hemmt hauptsächlich die Synthese der 45 S-Vorläufer der ribosomalen RNA (13) und 25-30% der hnRNA-

Synthese (26, 14, 13 und 11).

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß 3' dATP *in vitro* die RNA-Synthese und Poly(A)-Synthese hemmt, während 2' dATP nur die Synthese von Poly(A) inhibiert, wahrscheinlich durch Bindung an die Polymerase und daraus resultierender Inaktivierung des Enzyms. Andererseits hat 2' Desoxyadenosin *in vivo* keinen direkten Einfluß auf die RNA- oder Poly(A)-Synthese. Neben der Hemmung der gesamten Kern-RNA-Synthese durch Cordycepin ist noch eine zusätzliche Hemmung der Poly(A)-Synthese zu beobachten (Tabelle 4). Der Mechanismus der Hemmung der Poly(A)-Synthese *in vivo* beruht höchstwahrscheinlich ebenfalls auf einer Inaktivierung der Poly(A)-Polymerase durch Cordycepin.

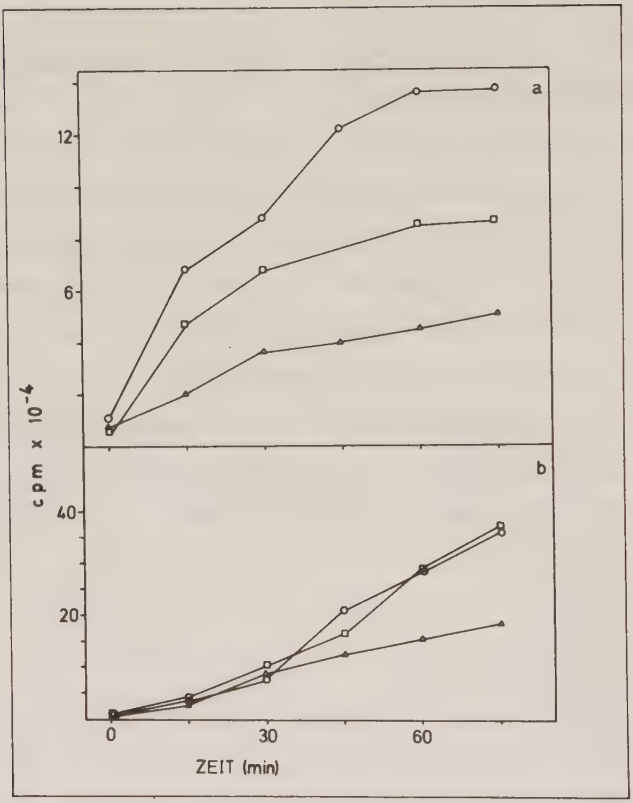

Abbildung 17: Einfluß von 2' Desoxyadenosin bzw. 3' Desoxyadenosin auf die RNA-Synthese in Ehrlich Asciteszellen.
a) Asciteszellen wurden durch Zentrifugation (800 rpm, 7 min) 10-fach konzentriert. Das Zellpellet wurde in 16ml Eagle's Medium resuspendiert und vor Versuchsbeginn 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Minuten mit 2' Desoxyadenosin bzw. 3' Desoxyadenosin (50µg/ml) bei 37°C inkubiert und danach unter den gleichen Bedingungen mit (^{3}H)-Adenosin (20µCi/ml) versetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots (500µl) in 5ml eiskalten 0,14M NaCl-10mM Tris pH 7,4 Puffer gegeben, abzentrifugiert (1000 x g) und in 350µl 0,14M NaCl Puffer aufgenommen. 150µl der Zellsuspension wurden auf Papierplättchen (4x4cm) pipettiert und die Radioaktivität im TCA-fällbaren Material gemessen.
b) Asciteszellen wurden 10-fach konzentriert und in 16ml Eagle's Medium ohne Phosphat resuspendiert. Die Inkubation wurde wie in a) beschrieben durchgeführt, außer daß die Zellen mit (^{32}P)-Orthophosphat markiert wurden.

O—O Kontrolle
□—□ 2' Desoxyadenosin
△—△ 3' Desoxyadenosin

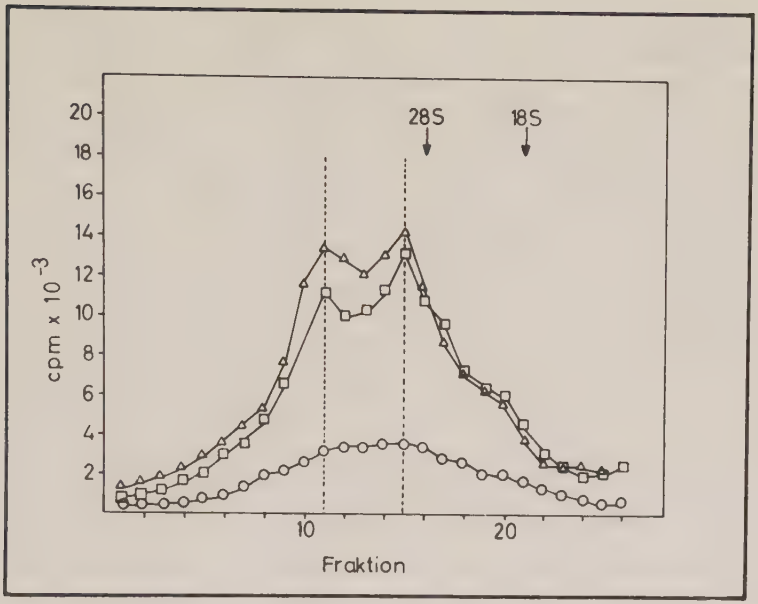

Abbildung 18: Analyse der Kern-RNA aus Ehrlich Asciteszellen auf Sucrose-Gradienten nach Zellbehandlung mit 3' Desoxyadenosin bzw. 2' Desoxyadenosin.
Asciteszellen ($6,4x10^5$/ml) wurden 10-fach konzentriert und in Phosphat-freiem Eagle's Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in 10ml pro Ansatz geteilt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in Gegenwart von 2' Desoxyadenosin bzw. 3' Desoxyadenosin zwei Minuten bei 37°C und danach mit (^{32}P)-Orthophosphat (50µCi/ml) für 30 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zentrifugiert (1000 x g), gewaschen und in 15ml Lysis-Puffer + 80µg/ml Dextran-Sulfat + 2mM UMP resuspendiert. Die Kern-RNA wurde extrahiert, nach Äthanol-Fällung in 0,5ml Puffer G gelöst und auf einen 15-30% Sucrose-SDS-Gradienten in Puffer G aufgetragen (etwa 150µg RNA pro Gradient). Die Laufzeit betrug 14 Stunden bei 22.000 upm (SW 41 Rotor) und 20°C. Der Inhalt jedes Röhrchens wurde in 27 Fraktionen gesammelt (0,5ml/Fraktion). 200µl von jeder Fraktion wurde auf Papierplättchen pipettiert und die Radioaktivität im TCA-fällbaren Material gemessen. Als Marker wurden ribosomale 28 S und 18 S RNA aus Ehrlich Asciteszellen auf parallele Gradienten aufgetragen.

△——△ Kontrolle
□——□ 2' Desoxyadenosin
○——○ 3' Desoxyadenosin

IV. DISKUSSION

Die Funktion und Struktur einer Zelle wird durch die selektive Expression ihrer genetischen Information bestimmt, wobei die Sequenzen in der DNA, die diese Information tragen, in die Form einer Polyribonukleotidkette umgewandelt werden, deren Basen-Sequenzen komplementär zu der in der DNA sind (mRNA) und die nach ihrem Transport in das Cytoplasma die Aminosäure-Sequenz in der Peptidkette bestimmen. Es wird allgemein postuliert, daß die mRNA nicht das direkte Produkt der Transkription ist, sondern durch die posttranskriptionelle Prozessierung eines 2-10mal größeren (6.000-15.000 Basen) RNA-Moleküls (hnRNA) entsteht (20). Die Prozessierung des hnRNA-Moleküls läuft wahrscheinlich in mehreren Etappen ab: Synthese von Poly(A)-Sequenzen am 3' Ende des Moleküls, Synthese einer Cap-Struktur am 5' Ende, Methylierung von Adenosin- und Guanosin-Basen innerhalb der Polynukleotidkette und Abspaltung der innerhalb der Kette befindlichen nicht-kodierenden Sequenzen; die zeitliche Reihenfolge dieser Prozesse ist unbekannt. Von der gesamten hnRNA-Population, die im Zellkern vorhanden ist, wird nur 30% polyadenyliert und von dieser erreichen nur 25% das Cytoplasma; Daten, die auf zwei verschiedene polyadenylierte hnRNA-Populationen im Zellkern hinweisen (43). Zwei verschiedene Arten der Poly(A)-Synthese wurden *in vivo* beobachtet: eine *de novo* Synthese am 3' OH-Ende der hnRNA, die 1000mal langsamer abläuft als die Transkription und ein Elongations-Prozeß der prä-synthetisierten Poly(A)-Kette, der wahrscheinlich mit einem Abbau-Prozeß der Poly(A)-Kette gekoppelt ist (14).

Diese unterschiedlichen Prozesse könnten durch verschiedene Formen der Poly(A)-Polymerase, die in vitro die nichttranskriptive Synthese von Poly(A)-Sequenzen katalysiert, durchgeführt werden. In Enzympräparationen aus Rattenleberzellkernen lassen sich drei verschiedenen Formen der Poly(A)-Polymerase nachweisen, ein Mg^{++}-abhängiges und zwei Mn^{++}-abhängige Enzyme, die bei unterschiedlicher Ionenstärke von einer CM-Cellulose Säule eluiert wurden (1). Zusammen mit dem Mg^{++}-abhängigem Enzym eluierten drei andere Enzymaktivitäten, die den DNA-unabhängigen Einbau von UMP, CMP und GMP in Poly(U)-, Poly(C)- und Poly(G)-Ketten katalysierten (Nukleotid-Polymerase). Diese Enzymaktivitäten wurden von den beiden Formen der Mn^{++}-abhängigen Poly(A)-Polymerase getrennt und konnten von der Mg^{++}-abhängigen Poly(A)-Polymerase durch ihre Mn^{++}-Abhängigkeit unterschieden werden.

Die Funktion der Nukleotid-Polymerase in vivo ist unbekannt; die Existenz von Oligo(U)-, Poly(C)- und Poly(G)-Sequenzen in verschiedenen Klassen von RNA (58,22,59) könnte auf eine Funktion dieser Enzyme in vivo hinweisen, dennoch sind keine Versuche bekannt, die diese Beziehung nachweisen.

Da die ATP-, CTP-, UTP- und GTP-abhängigen enzymatischen Aktivitäten in demselben Zellkernextrakt vorkamen und ähnliche Eigenschaften besaßen, wurde in der vorliegenden Arbeit durch Anwendung der Affinitäts-Chromatographie versucht, diese enzymatischen Aktivitäten voneinander zu trennen. Zu diesem Zweck wurde ATP, das spezifische Substrat für die Poly(A)-Polymerase Reaktion, an Sepharose gebunden und als Chromatographie Gel verwendet. Obwohl ATP Substrat für sehr viele

Enzyme ist, wurde die Poly(A)-Polymerase 1557fach gereinigt; leider wurde die erwartete Trennung der verschiedenen Formen der Poly(A)-Polymerase und der Nukleotid-Polymerase nicht erreicht.

Aus Abbildung 3 ist zu ersehen, daß die Poly(U)-, Poly(C)- und Poly(G)-Polymerase offenbar eine geringere Affinität als die Poly(A)-Polymerase zu dem ATP-Sepharose Gel aufweist. Hingegen scheint die einmal gebundene Nukleotid-Polymerase eine ähnliche starke Bindung wie die Poly(A)-Polymerase zu ATP-Sepharose zu haben, da alle Enzymaktivitäten gemeinsam bei der gleichen ATP-Konzentration eluieren.

Die Existenz von Enzymen, die die nichttranskriptive Synthese von Polyribonukleotiden katalysieren, ist keine Besonderheit der Rattenleberzellkerne. Ähnliche katalytische Aktivitäten wurden in Extrakten aus Ehrlich Asciteszellkernen festgestellt (Kap. 3.2.). Die Enzyme aus Asciteszellkernen zeigten jedoch ein anderes Verhalten gegenüber Ionenaustauschern als die Enzyme aus Rattenleberzellkernen. Trotzdem sind die Enzyme aus den Zellkernen von Rattenleber und Asciteszellen vergleichbar, da beide ein identisches Molekulargewicht besitzen und ihre enzymatischen Reaktionen durch α-Amanitin (Inhibitor der RNA-Polymerase) und Actinomycin D (Inhibitor der Transkription) nicht gehemmt werden konnten. Außerdem sprechen die Ähnlichkeit der pH-Werte zur Erreichung der maximalen Aktivität (beide pH 8,4), die Ionen-Abhängigkeit der Reaktionen (Mn^{++} und in geringerem Maße Mg^{++}) und die Reaktionsprodukte (Poly(A)-, Poly(U)-, Poly(C)- und Poly(G)-Sequenzen) für ähnliche Enzym-Proteine in beiden Zellkern-Extrakten.

Die Existenz einer enzymatischen Aktivität, die den Einbau von GMP in Poly(G) katalysiert, ist in den Asciteszellkern-Extrakten unsicher. Die niedrige Einbaurate von (^{3}H)-GTP in die Poly(G)-Kette konnte von den Hintergrundswerten der Radioaktivität nicht unterschieden werden; nur durch indirekte Test-Methoden konnte die Existenz einer Poly(G)-Polymerase Aktivität nachgewiesen werden (s. "nearest-neighbour" Sequenzanalyse der Ribonukleotid-Copolymerprodukte).

Eine Trennung der Nukleotid-Polymerase von der Poly(A)-Polymerase wurde in Extrakten aus Ehrlich Asciteszellkernen nicht erreicht. Trotzdem wurde ein Unterschied in dem Verhalten der beiden Enzym-Proteine gegenüber ihrer Primer-Spezifität beobachtet: die Poly(A)-Polymerase konnte als einziges Enzym das synthetische Oligonukleotid $(Ap)_3A$ und $(Ap)_5A$ als Primer der enzymatischen Reaktion benutzen (Tabelle 2). Weder die Poly(U)- noch die Poly(C)-Polymerase konnten diese Oligonukleotide als Primer verwenden, was darauf hinweist, daß die Poly(A)-Polymerase und die Nukleotid-Polymerase aus Asciteszellkernen ebenso zwei verschiedene Enzyme sind, wie es für Enzympräparationen aus Rattenleberzellkernen gezeigt wurde (1). Der Einbau von AMP-Resten nur an die Oligonukleotide $(Ap)_3A$ und $(Ap)_5A$ könnte auf die Funktion dieser Poly(A)-Polymerase in vivo hinweisen, bereits prä-synthetisierte Poly(A)-Ketten zu elongieren. Dagegen spricht allerdings, daß der Einbau von AMP in $(Ap)_3A$ vollständig gehemmt wurde, wenn Cordycepintriphosphat in dem Inkubationsansatz anwesend war, eine Substanz, die den Elongations-Prozeß der Poly(A) Kette in vivo nicht hemmt.

In Gegenwart von $(Up)_3U$, $(Cp)_3C$ bzw. Poly(U) als Primer der Nukleotid-Polymerasen-Reaktion konnte keine enzymatische Aktivität festgestellt werden (Tabelle 2). Hierbei mögen die Kettenlängen bzw. strukturelle Besonderheiten von Poly(U) eine Rolle spielen, denn "nearest-neighbour" Sequenzanalysen der in vitro synthetisierten Poly(A)-, Poly(U)- und Poly(G)-Sequenzen zeigten keinen preferentiellen Einbau von α-^{32}P-Radioaktivität in eines der letzten Nukleotide des RNA-Primer-Moleküls (Tabellen 5 und 6). Die Tatsache, daß in vivo nur 30% der hnRNA-Population, die im Zellkern vorhanden ist, polyadenyliert wird, spricht für die Existenz von Erkennungs-Sequenzen für das Poly(A)-Polymerase Enzym am 3' Ende des hnRNA-Moleküls. Untersuchungen über die Basen-Sequenzen am 3' Ende von verschiedenen Poly(A)-haltigen mRNAs ergab eine ähnliche Zusammensetzung und Lage für zwei Nukleotid-Sequenzen innerhalb der mRNA: zwischen 20 und 25 Basen von dem 3' Ende entfernt lag die Sequenz --(A-A-U-A-A-A)-- und direkt am 3' Ende lag bei 5 der 6 mRNAs die End-Sequenz -(G-C) (60). Diese gemeinsamen Sequenzen könnten direkt oder durch die Bildung von bestimmten doppel-strängigen Strukturen eine Rolle bei der Erkennung des 3' Endes der RNA durch das Poly(A) Polymerase Enzym in vivo spielen. Dennoch blieben Versuche in vitro zum Nachweis einer solchen Spezifität erfolglos, wahrscheinlich wegen des relativ hohen Anteils an Ribonukleasen, die in den Poly(A)-Polymerase Präparationen vorhanden sind (6).

Bei der Anwendung der Inhibitoren der Poly(A)-Polymerase und der Nukleotid-Polymerase wurde neben Cordycepintriphosphat und

2'-Desoxyadenosintriphosphat auch der Einfluß nicht-markierter Nukleotide auf beide enzymatischen Reaktionen untersucht (Tabelle 4). Die Hemmung des Einbaus von radioaktivem ATP in die Poly(A)-Kette durch die anderen drei Nukleotide kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden: 1. Inaktivierung bzw. kompetitive Hemmung der Poly(A)-Polymerase durch Bindung von UTP, GTP und CTP z.B. im aktiven Zentrum des Enzyms oder 2. auf den mit der Poly(A)-Polymerase Reaktion konkurrierenden Einbau von nicht-markierten Nukleotiden in die wachsende Poly(A) Kette. In diesem letzteren Fall würde eine Verdünnung der AMP-Radioaktivität in der Poly(A)-Kette eintreten, was zu einem erniedrigten Gesamteinbau von (^{3}H)-AMP führt. Eine ähnliche Annahme kann für die Hemmung der Nukleotid-Polymerase gemacht werden.

Die "nearest-neighbour" Sequenzanalyse der Reaktionsprodukte, die in Gegenwart der vier Nukleosidtriphosphate synthetisiert wurde, zeigt deutlich die Präsenz von ^{32}P-Radioaktivität in allen vier Nukleotiden obwohl nur ein Nukleosidtriphosphat α-^{32}P-markiert war (Tabellen 5 und 6). Diese "Übertragung" der ^{32}P-Radioaktivität auf das jeweils benachbarte Nukleotid kann nur bei der alkalischen Hydrolyse einer Ribonukleotid-Copolymerkette stattgefunden haben. Die empfindliche Methode, die bei der Analyse der Reaktionsprodukte angewendet wurde (Dünnschicht-Chromatographie) und die ähnlichen Ergebnisse mehrerer identischer Inkubationsansätze sprechen für die tatsächliche Synthese eines Ribonukleotid-Copolymer-Moleküls. Außerdem zeigt die Analyse der Reaktionsprodukte durch die Gelelektrophorese unter extrem denaturierenden Bedingungen

(99% Formamid) deutlich eine kovalente Bindung des Ribonukleotid-Copolymers an den Primer (Abbildung 14).

Die Bildung eines Ribonukleotid-Copolymer-Moleküls durch die Nukleotid-Polymerasen aus Rattenleberzellkernen und Ascites-zellkernen weist auf eine kooperative Interaktion der Enzyme vielleicht in Form eines Protein-Komplexes hin. Die Bildung des Ribonukleotid-Copolymers kann nicht auf eine Synthese durch die RNA-Polymerase zurückgeführt werden, da unter gleichen Inkubationsbedingungen, aber in Gegenwart von nur einem Nukleosidtriphosphat, eine Ribonukleotid-Homopolymerkette synthetisiert wird. Die Möglichkeit von parallelen Synthesen in Gegenwart der vier Nukleosidtriphosphate von denen eins α-^{32}P-markiert ist, d.h. die Synthese eines Ribonukleotid-Copolymers durch die RNA-Polymerase und die Synthese eines Ribonukleotid-Homopolymers durch eine Nukleotid-Polymerase, ist ebenfalls sehr unwahrscheinlich. In diesem Fall würde eine "nearest-neighbour" Sequenzanalyse der Reaktionsprodukte eine überwiegende Menge an Radioaktivität in dem Nukleotid aufweisen, das in die Ribonukleotid-Homopolymerkette eingebaut worden ist. Die Daten in Tabelle 5 und 6 zeigen jedoch, daß die Menge an Radioaktivität in dem Ribonukleotid-Copolymer gleichmäßig unter den vier Nukleosidmonophosphaten verteilt ist. Untersuchungen über die Kontamination der Nukleotid-Polymerasen durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase hatten weiter gezeigt, daß in Gegenwart von DNA nur eine sehr geringe RNA-Polymerase Aktivität (4% der Nukleotid-Polymerase) in der Enzympräparation nachzuweisen war. Die Präsenz von ^{32}P-Radioaktivität in GMP in den durch die Nukleotid-Poly-

merasen aus Asciteszellkernen synthetisierten Ribonukleotid-Copolymeren deutet an, daß eine geringe Aktivität an Poly(G)-Polymerase in dieser Enzympräparation vorhanden ist.

In Hinblick auf die Basensequenz scheint die Synthese des Ribonukleotid-Copolymers durch die Nukleotid-Polymerasen kein rein zufälliger Prozeß zu sein, da die Sequenzen $(ApA)_n$, $(UpU)_n$, $(ApG)_n$ und $(UpC)_n$ häufiger als andere Nukleotid-Kombinationen in der Ribonukleotid-Copolymerkette vorkommen; man kann vermuten, daß das Produkt der Reaktion eine bestimmte Population von RNA-Molekülen sein wird, die vielleicht ähnliche Funktionen übernehmen könnten.

Die Existenz von Nukleotid-Polymerasen in Extrakten aus Ehrlich Asciteszellkernen und aus Rattenleberzellkernen wirft die Frage über die Funktion dieser katalytischen Aktivitäten *in vivo* auf. Neben der nichttranskriptiven Synthese eines Ribonukleotid-Copolymers könnte die DNA-unabhängige Synthese von Ribonukleotid-Homopolymeren *in vivo* Aufgabe dieses Enzym-Komplexes sein.

Neben den Poly(A)-Sequenzen am 3' Ende des hnRNA- und mRNA-Moleküls sind zwei Oligoribonukleotidketten innerhalb des hnRNA-Moleküls vorhanden: eine Oligo(A)-Sequenz (etwa 20-30 Nukleotide lang) und mehrere Oligo(U)-Sequenzen, die am 5' Ende der hnRNA liegen (13,24). Die Synthese der Oligo(A)-Sequenzen *in vivo* wird stark durch Actinomycin D gehemmt, demgegenüber hat Cordycepin, Hemmer der Poly(A)-Synthese, keinen Einfluß auf die Synthese der Oligo(A)-Sequenzen, was auf einen transkriptiven Prozeß in der Synthese dieser Sequenzen hindeutet (13). Zwei bis drei Oligo(U)-Sequenzen

sind am 5' Ende eines Poly(A)$^+$-hnRNA-Moleküls, das größer als 20.000 Nukleotide ist, vorhanden. Kontrollierte Spaltungen dieser hnRNA-Sequenzen führten zunehmend und in dem Maße zum Verlust von mehr als 90% der Oligo(U)-Sequenzen, wie sich die hnRNA-Population der mRNA-Größe anglich (24). Etwa 20% der cytoplasmatischen mRNA-Population enthielten Oligo(U)-Sequenzen, deren Größe den Oligo(U)-Sequenzen in der hnRNA entsprachen (23).

Eine Rolle der Oligo(U)-Sequenzen bei der Prozessierung eines Teiles der hnRNA-Population aus Seeigel Embryonen wurde postuliert, da sich der Anteil an Oligo(U)-Sequenzen in der Poly(A)$^+$-hnRNA während der Embryogenese stark veränderte (61). Die Präsenz von Oligo(U)-Sequenzen zusammen mit den Poly(A)-Sequenzen in der hnRNA könnte durch Bildung von doppel-strängigen Strukturen die Prozessierung dieser hnRNA-Moleküle bestimmen (61,62), wobei der relativ hohe Anteil an Oligo(U)-Sequenzen in der Poly(A)$^-$-hnRNA für verschiedene Signale bei der Prozessierung der beiden hnRNA-Populationen verantwortlich sein kann.

Neben der hnRNA und mRNA ist eine andere Klasse von RNA isoliert worden, deren Sequenzen mehr als 50% UMP-Reste enthielt (63). Diese RNA wurde aus Muskeln von Hühnerembryonen gewonnen und als Inhibitor der Translation von mRNA im zellfreien System charakterisiert (Translations-Kontroll-RNA, tkRNA). Die Oligo(U)-Sequenzen in der tkRNA waren 10-20 Nukleotide lang und wurden nur in den tkRNA-Molekülen, die mit mRNA-Ribonukleoproteinpartikeln assoziiert waren, gefunden. Die Authoren postulieren, daß in diesem Komplex die tkRNA die Translation

der mRNA durch eine doppel-strängige Struktur verhindert, die durch die Basen-Komplementarität zwischen den Poly(A)-Sequenzen in der mRNA und den Oligo(U)-Sequenzen in der tkRNA zustande kommt. Durch die Spaltung der Oligo(U)-Sequenzen würde die mRNA freigesetzt werden, um in den Polyribosomen translatiert zu werden. Eine eventuelle nichttranskriptive Synthese der Oligo(U)-Sequenzen in vivo durch die Poly(U)-Polymerase kann nur bei gleichzeitiger Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Synthese untersucht werden. Für diesen Zweck schien Actiomycin D geeignet zu sein. Die Zugabe von 1-5µg Actinomycin D pro ml Zellsuspension führt zur sofortigen Hemmung des Transkriptions-Prozesses (21). Da in vitro die Poly(U)-Polymerase Reaktion Primer-abhängig ist, würde eine Inhibition der RNA-Synthese für längere Zeiten indirekt auch hemmend auf die nichttranskriptive Synthese der Oligo(U)-Sequenzen in vivo durch Mangel an hnRNA-Primermolekülen in Zellkernen wirken. Aus diesem Grund wurde eine Asciteszellsuspension zwei Minuten mit einer Konzentration von 10µg Actinomycin D pro ml behandelt. Es ist bekannt, daß Actinomycin D Nebenwirkungen, besonders beim Abbau von hnRNA-Molekülen, zeigt (64). Durch kurze Inkubationszeiten wurde die Möglichkeit eines Nebeneffektes des Inhibitors gering gehalten.

In Gegenwart von Actinomycin D wird die Synthese von Oligo(U) sehr viel stärker gehemmt als die gesamte Kern-RNA-Synthese (Tab.10). In diesem Versuch wird die durch Actinomycin D bewirkte Hemmung der Oligo(U)-Synthese verglichen mit der der gesamten Kern-RNA-Synthese. Letztere hat aber einen Anteil von etwa 5-7% nichttranskriptive RNA-Synthese; dies erklärt

die unterschiedliche starke Hemmung.

Im Gegensatz zur nichttranskriptiven Addition von Poly(A) in vivo, die sehr wahrscheinlich erst nach Fertigstellung des hnRNA-Moleküls erfolgt, ist die beobachtete ausgeprägte Hemmung der Oligo(U)-Synthese kein zwingender Beweis für dessen transkriptive Synthese: Actinomycin D hemmt die RNA-Synthese durch Bindung an die Desoxyguanosin-Basen in der DNA-Kette und verhindert dadurch die Bewegung der RNA-Polymerase entlang des DNA-Moleküls; das 3'-OH Ende des gerade synthetisierten RNA-Moleküls bleibt in dem Komplex zwischen RNA-Polymerase und DNA-Molekül eingeschlossen und ist dadurch unerreichbar für eine eventuelle DNA-unabhängige Synthese von Poly(U)-Sequenzen an ihrem 3' Ende durch die Poly(U)-Polymerase. Da die Oligo(U)-Sequenz nur im inneren des hnRNA-Moleküls zu finden ist, wäre im Falle seiner nichttranskriptiven Synthese die Existenz einer RNA-Ligase zu postulieren. Zudem ließen sich in der DNA Oligo-(dA)-Sequenzen nachweisen, die vielleicht als Matritze für die Oligo(U)-Synthese fungieren (22). Die Poly(A) Sequenzen am 3' Ende der hnRNA und mRNA sind die einzigen Sequenzen, die eindeutig in einem nichttranskriptiven Prozeß synthetisiert werden (Tabelle 9). Der unterschiedliche Hemmungsgrad ihrer Synthese durch Cordycepin und Actinomycin-D im Vergleich zu der Hemmung der RNA-Synthese und die Abwesenheit von Poly(dT)-Sequenzen in der DNA (100-200 Basen lang) sprechen für einen DNA-unabhängigen Prozeß in der Poly(A)-Synthese. Die Abwesenheit von mRNA in Polyribosomen von Zellen nach Hemmung der Poly(A)-Synthese durch Cordycepin weist auf eine entscheidende Funktion der Poly(A)-

Sequenzen in den Vorgängen hin, die zur Entstehung der mRNA-Moleküle oder deren Transport in das Cytoplasma führen. Dennoch spricht die Existenz von mRNA-Populationen, die keine Poly(A)-Sequenzen enthalten (z.B. Histon-mRNA), gegen eine absolute Notwendigkeit der Polyadenylierung als einziger Mechanismus, der zur Bildung von mRNA führt (45). Außerdem spricht die Tatsache, daß ein Teil der Poly(A)-Sequenzen im Kern abgebaut wird, gegen die Polyadenylierung der hnRNA als Faktor, der die Erhaltung der mRNA-Sequenzen in der hnRNA sichern könnte (65). Aus diesem Grund haben die Poly(A)-Sequenzen wahrscheinlich eine Bedeutung nur für den Teil der hnRNA-Population, der zum Erscheinen von polyadenylierter mRNA in den Polyribosomen führt. Untersuchungen über eine eventuelle Funktion der Poly(A)-Sequenzen bei der Translation von mRNA weisen darauf hin, daß die Abwesenheit der Poly(A)-Kette keinen Einfluß auf die Initiation, Elongation oder Termination der Protein-Synthese in vitro hatte (66). Dennoch zeigten Untersuchungen der Translation-Effizienz von Poly(A)$^-$-RNA (z.B. Poly(A)$^-$-Globin-mRNA) über längere Zeit eine niedrigere Stabilität dieser mRNA als die polyadenylierte mRNA; durch Hybridisierung gegen Globin-cDNA wurde festgestellt, daß 56 Stunden nach Injektion von Poly(A)$^-$-Globin-mRNA in Xenopus Oocyten 85% der mRNA-Population abgebaut worden war. Demgegenüber blieb die gesamte Poly(A)$^+$-Globin-mRNA-Population unverändert (67). Die Polyadenylierung der Poly(A)$^-$-Globin-mRNA führte zu der Wiederherstellung der mRNA-Stabilität, die der Stabilität von normaler Globin-mRNA nahekommt (68). Mindestens 32 AMP-Reste waren notwendig, um die Stabilität der Globin-mRNA während der Translation wie-

derzugewinnen (69). Die Länge der Inkubationszeit, die notwendig ist, um einen Unterschied in der Translations-Effizienz der beiden Klassen von mRNA nachweisen zu können und die Heterogenität des Translations-Systems, machen die Übertragung dieser Ergebnisse auf die Prozesse, die in vivo stattfinden, fragwürdig. Untersuchungen des Metabolismus der Poly(A)$^-$-mRNA aus HeLa-Zellen in vivo zeigen andererseits keinen Unterschied in der Abbau-Kinetik zwischen beiden mRNA-Populationen (70). Dennoch sprechen die de novo Synthese der Poly(A)-Sequenzen im Zellkern und die Abwesenheit von mRNA in Polyribosomen von Cordycepin-behandelten Zellen für eine Funktion der Poly(A)-Sequenzen im Zellkern.

Eine post-transkriptionelle Kontrolle der mRNA-Population im Zellkern könnte durch die Regulation der Länge der Poly(A)-Kette stattfinden. Bei der Synthese der Poly(A)-Sequenzen sind zwei Prozesse bekannt: de novo Synthese, d.h. Synthese an das hnRNA-Primer-Molekül und ein Elongations-Prozeß der prä-synthetisierten Poly(A)-Sequenzen. Dieser letztere Prozeß ist wahrscheinlich mit einem Abbau der AMP-Reste in der Poly(A)-Kette gekoppelt (14). Außerdem haben Sawicki und Mitarbeiter gezeigt (14), daß nur die mRNA's, die eine Poly(A)-Kette von 200 Nukleotiden oder länger besitzen, das Cytoplasma erreichen. Damit könnte die Population von mRNA im Zellkern durch die Regulation des Elongations- und Abbau-Prozesses der Poly(A)-Sequenzen kontrolliert werden: durch den Elongations-Prozeß der Poly(A)-Kette würde die Kettenlänge erreicht, die notwendig ist, um die Poly(A)$^+$-mRNA in das Cytoplasma zu bringen, andererseits würde durch

den Abbau der Poly(A)-Kette ein gleichzeitiger Abbau des mRNA-Moleküls zustande kommen. Beide Prozesse würden im Gleichgewicht für eine konstante polyadenylierte mRNA-Population im Zellkern sorgen; diese Regulation könnte die Existenz von zwei verschiedenen Poly(A)-Populationen erklären: eine, die im Cytoplasma erscheint (25% der Kern Poly(A)$^+$-RNA) und eine andere, die im Zellkern zerfällt. In dem Fall, in dem der Elongations-Prozeß bevorzugt wird, erreicht dann eine größere Anzahl von Poly(A)$^+$-mRNA das Cytoplasma. Dieser letztere Prozeß scheint bei der Akkumulation von mRNA im Cytoplasma von 3T3 und 3T6 Mäusezellen während ihres Wachstum-Stadiums stattzufinden: im Vergleich zu nicht wachsenden Zellen findet man, daß in proliferierenden Zellen die doppelte Menge der im Zellkern gebildeten polyadenylierten Sequenzen in das Cytoplasma transportiert wird (71).

Aus den o.g. zahlreichen und sich zum Teil widersprechenden Daten wird deutlich, daß die nichttranskriptive Addition von Poly(A) an das mRNA-Segment der hnRNA wahrscheinlich von sehr großer Bedeutung für die Genexpression einer Zelle ist. Allgemein gültige Schlußfolgerungen über die funktionelle Rolle der Poly(A)-Sequenz lassen sich zur Zeit jedoch nicht aufstellen.

In diesem Zusammenhang soll noch einmal das vielleicht wichtigste Ergebnis der vorliegenden Untersuchung herausgestellt werden: der Nachweis, daß der Zellkern über ein Enzymsystem verfügt, das in der Lage ist, in vitro Ribonukleinsäuren nichttranskriptiv, also unabhängig von einer DNA-Matritze, zu synthetisieren. Ob und wieweit ein solcher

Prozeß auch in vivo abläuft, ist unklar. Ein nicht geringer Teil der RNA-Synthese des Zellkerns läßt sich durch Actinomycin D nicht inhibieren. Man kann vermuten, daß diese Actinomycin D-resistente RNA-Synthese zum Teil auf das Zusammenwirken der Nukleotid-Polymerasen zurückzuführen ist. Ein direkter Nachweis der Richtigkeit dieser Annahme ist zur Zeit aufgrund unüberwindbarer methodischer Schwierigkeiten nicht möglich.

Zusammenfassung

In Enzympräparationen aus Kernen von Rattenleberzellen und Ascitestumorzellen sind Nukleotid-Polymerasen nachweisbar, die durch Polymerisation von ATP, UTP, CTP und GTP die entsprechenden Ribonukleotid-Homopolymere Poly(A), Poly(U), Poly(C) und Poly(G) synthetisieren. Diese DNA-unabhängige Synthese benötigt eine Primer-RNA, an deren 3'-OH-Ende durch successive Addition von Nukleotiden Ribonukleotid-Homopolymere mit einer Kettenlänge bis zu 6 Nukleotiden entstehen. Die nähere Untersuchung dieser Enzyme erbrachte folgende Ergebnisse:

1. Durch Affinitätschromatographie einer Enzympräparation aus Rattenleberzellkernen an ATP-Sepharose wurde eine 1557-fache Reinigung der Poly(A)-Polymerase erreicht. Im Vergleich zu Poly(A)-Polymerase zeigten die Poly(U)-, Poly(G)- und Poly(C)-Polymerasen eine deutlich geringere Affinität zu dem immobilisierten ATP. Die gebundenen Enzymaktivitäten eluieren gemeinsam bei einer ATP-Konzentration von 0,9mM aus der ATP-Sepharose Säule.

2. Die Nukleotid-Polymerasen aus Ehrlich Asciteszellkernen zeigen das gleiche Molekulargewicht (40.000-45.000) wie die Enzyme aus Rattenleberzellkernen. Daneben sprechen die Ähnlichkeit der pH- und Ionen-Abhängigkeit der Enzyme zur Erreichung der maximalen Aktivität dafür, daß es sich hierbei um ähnliche oder identische Enzyme handelt. Die enzymatischen Reaktionen sind Primer-RNA-abhängig und werden von α-Amanitin (Inhibitor der RNA-Polymerase) und Actinomycin D (Inhibitor der Transkription) nicht gehemmt. Demgegenüber hemmen Cordycepintriphosphat (3'dATP) und

2'dATP bei einer Konzentration von 100µM die Polymerisations-Reaktionen vollständig.

3. Untersuchungen über den Einfluß von 3'-Desoxyadenosin auf die RNA-Synthese in vivo zeigten, daß 3'-Desoxyadenosin die RNA-Synthese nach ^{3}H-Uridin oder ^{3}H-Adenosin-Markierung zu 55% hemmt. Eine ähnlich starke Hemmung der RNA-Synthese wurde für 2'-Desoxyadenosin beobachtet. Dieser unerwartete inhibitorische Effekt von 2'-Desoxyadenosin beruht höchstwahrscheinlich auf einer Hemmung der Aufnahme von ^{3}H-Nukleosiden in die Zelle durch 2'-Desoxyadenosin.

4. Die Funktion der Poly(U)-, Poly(C)- und Poly(G)-Polymerase in vivo ist unbekannt. Neben der Existenz von Poly(A)-Sequenzen am 3'-Ende der hnRNA und mRNA sind Oligo(U)-Sequenzen (30 bis 40 Nukleotide lang) am 5'-Ende der hnRNA vorhanden. Untersuchungen über eine eventuelle nichttranskriptive Synthese dieser Sequenzen, bei denen Actinomycin D als Hemmer der DNA-abhängigen RNA-Synthese verwendet wurde, ergab, daß 97% der Oligo(U)-Synthese durch Actinomycin D gehemmt wurde, was auf eine DNA-abhängige Synthese dieser Sequenzen hindeutet.

5. Neben der Synthese von Ribonukleotid-Homopolymeren sind die Nukleotid-Polymerasen in der Lage, nichttranskriptiv (DNA-unabhängig) Ribonukleotid-Copolymere zu synthetisieren. Eine "nearest-neighbour"-Sequenzanalyse der Reaktionsprodukte, die in Gegenwart der vier Nukleosidtriphosphate (eins davon α-^{32}P-markiert) synthetisiert wurden, zeigte eine Verteilung der ^{32}P-Radioaktivität in den Nukleosid-

monophosphaten, die für die Synthese eines Ribonukleinsäure-Moleküls spricht. Die Synthese des Ribonukleotid-Copolymers kann nicht auf die Enzymaktivität von einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase zurückgeführt werden, weil: 1. die RNA-Polymerase-Aktivität in den Nukleotid-Polymerase-Präparationen in Anwesenheit von DNA nur 4% der Poly(A) Polymerase-Aktivität betrug und 2. die Verteilung der ^{32}P-Radioaktivität in den Nukleosidmonophosphaten gegen eine parallele Synthese eines Ribonukleotid-Copolymers durch die RNA-Polymerase und eines Ribonukleotid-Homopolymer-Moleküls durch eine der Nukleotid-Polymerasen spricht. Da in vivo etwa 5-7% der RNA-Synthese Actinomycin D-resistent ist, könnte die in vitro RNA-Synthese durch die Nukleotid-Polymerasen der Actinomycin D-resistenten RNA-Synthese in vivo entsprechen.

Abkürzungen:

ATP	Adenosintriphosphat
Ci	Curie
CTP	Cytidintriphosphat
cpm	Impulse pro Minute
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
2'dA	2'-Desoxyadenosin
2'dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
3'dA	3'-Desoxyadenosin
3'dATP	3'-Desoxyadenosintriphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
PEI-Cellulose	Polyäthylenimin-Cellulose
POPOP	2,2'-p-Phenylenbis-(4-methyl-5-phenyl-oxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonukleinsäure
hnRNA	heterogenous nuclear RNA
mRNA	messenger RNA
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	transfer RNA
S	Sedimentationskonstante
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-Hydroxymethyl-aminomethan
UTP	Uridintriphosphat

Literaturverzeichnis

1. J. Niessing
Eur. J. Biochem. 59, 127 (1975)

2. R. Lamed, Y. Levin und A. Oplatka
Biochim. Biophys. Acta 305, 163 (1973)

3. R. Palacios, R.D. Palmiter und R.T. Schimke
J. Biol. Chem. 247, 2316 (1972)

4. A.A. Spector, J.E. Fletcher und J.D. Ashbrook
Biochem. 10, 3229 (1971)

5. J. Niessing und C.E. Sekeris
Nature New Biology 243, 9 (1973)

6. M. Edmonds und M.A. Winters
Progr. Nuc. Ac. Res. 17, 149 (1976)

7. H.M. Sobell, S.C. Jain, T.D. Sakore und C.E. Nordman
Nature New Biology 231, 200 (1971)

8. K.H. Seifart und B.J. Benecke
Eur. J. Biochem 53, 293 (1975)

9. B. Horowitz, B.A. Goldfinger und J. Marmur
Arch. Biochem. Biophys. 172, 143 (1976)

10. G. Maale, G. Stein und R. Mans
Nature 255, 82 (1975)

11. J.E. Darnell, L. Philipson, R. Wall und M. Adesnik
Science 174, 507 (1971)

12. J. Diez und G. Brawerman
Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 4091 (1974)

13. H. Nakazato, M. Edmonds und D.W. Kopp
Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 200 (1974)

14. S.W. Sawicki, W. Jelinek und J.E. Darnell
J. Mol. Biol. 113, 219 (1977)

15. K.M. Rose, L.E. Bell und S.T. Jacob
Nature 267, 178 (1977)

16. G. Brawerman
Progr. Nuc. Ac. Res. 17, 117 (1976)

17. L.A. Haff und E.B. Keller
J. Biol. Chem. 250, 1838 (1975)

18. K. Randerath und E. Randerath
Methods in Enzymology 12A, 323 (1967)

19. J.C. Pinder, D.Z. Staynov und W.B. Gratzer
Biochem. 13, 5373 (1974)

20. J.E. Darnell
Progr. Nuc. Ac. Res. 19, 493 (1976)

21. E. Reich, R.M. Franklin, A.T. Shatkin und E.L. Tatum
Biochem. 48, 1238 (1962)

22. G.R. Molloy, W.L. Thomas und J.E. Darnell
Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 3684 (1972)

23. E.L. Korweck, H. Nakasato, S. Venkatesan und M. Edmonds
Biochem. 15, 4643 (1976)

24. G.R. Molloy, W. Jelinek, M. Salditt und J.E. Darnell
Cell 1, 43 (1974)

25. H. Klenow und S. Frederiksen
Biochim. Biophys. Acta 87, 495 (1964)

26. S. Penman, M. Rosbash und M. Penman
Proc. Natl. Acad. Sci. 67, 1878 (1970)

27. J. Chauveau, Y. Moule und C. Rouillier
Exptl. Cell Res. 11, 317 (1956)

28. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

29. J.K. Inman und H.M. Dintzis
Biochem. 8, 4074 (1969)

30. U.K. Laemmli
Nature 227, 680 (1970)

31. T.W. Borun, M.D. Scharff und E. Robbins
Proc. Natl. Acad. Sci. 58, 1977 (1967)

32. M. Breindl und D. Gallwitz
Eur. J. Biochem. 32, 381 (1973)

33. F. Jacob und J. Monod
J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)

34. R.G. Roeder und W.J. Rutter
Nature 224, 234 (1969)

35. M.J. Chamberlin
Annual Rev. of Biochem. 43, 721 (1974)

36. R.P. Perry
Annual Rev. of Biochem. 45, 605 (1976)

37. H.F. Lodish
Annual Rev. of Biochem. 45, 39 (1976)

38. B. Lewin
Cell 4, 77 (1975)

39. U. Schibler, D.E. Kelley und R.P. Perry
J. Mol. Biol. 115, 695 (1977)

40. M. Edmonds, M.H. Vaughan und H. Nakazato
Proc. Natl. Acad. Sci. 68, 1336 (1971)

41. S.Y. Lee, J. Mendecki und G. Brawerman
Proc. Natl. Acad. Sci. 68, 1331 (1971)

42. J. Mendecki, S.Y. Lee und G. Brawerman
Biochem. 11, 792 (1972)

43. R.P. Perry, D.E. Kelley und J. LaTorre
J. Mol. Biol. 82, 315 (1974)

44. B.P. Brandhorst und E.H. McConkey
Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 3580 (1975)

45. M. Adesnik und J.E. Darnell
J. Mol. Biol. 67, 397 (1972)

46. J.R. Nevins und W.K. Joklik
J. Biol. Chem. 252, 6939 (1977)

47. A. Pelicer, J. Salas und M.L. Salas
Biochim. Biophys. Acta 378, 107 (1975)

48. M. Edmonds und R. Abrams
J. Biol. Chem. 235, 1142 (1960)

49. J.T. August, P.J. Ortiz und J. Hurwitz
J. Biol. Chem. 237, 3786 (1962)

50. H.G. Klemperer
Biochim. Biophys. Acta 72, 416 (1963)

51. J.S. Twu und R.K. Bretthauer
Biochem. 10, 1576 (1971)

52. N. Hozumi, I. Haruna, I. Watanabe, K. Mikoshiba und Y. Tsukada
Nature 256, 337 (1975)

53. J. Niessing und C.E. Sekeris
Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 673 (1974)

54. S. Brishammar und N. Juntti
Biochim. Biophys. Acta 383, 351 (1975)

55. J. Austoker, D. Cox und A.P. Mathias
Biochem. J. 129, 1139 (1972)

56. G.I. Milchev und A.A. Hadjiolov
Eur. J. Biochem. 84, 113 (1978)

57. R. Stern, A. Twanmoh und H.L. Cooper
Exptl. Cell Res. 78, 136 (1973)

58. E.M. Chumakov und V.I. Agol
Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 551 (1976)

59. L. Lim, N. Canellakis und E.S. Canellakis
Biochim. Biophys. Acta 209, 112 (1970)

60. N.J. Proudfoot, C.C. Cheng und G.G. Brownlee
Progr. Nuc. Ac. Res. 19 123 (1976)

61. L.M. Dubroff
Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 2217 (1977)

62. V.M. Kish und T. Pederson
Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 1426 (1977)

63. A.J. Bester, D.S. Kennedy und S.M. Heywood
Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 1523 (1975)

64. T.J. Lindell
Nature 263, 347 (1976)

65. B. Lewin
Cell 4, 11 (1975)

66. A.E. Sippel, J.G. Stavrianopoulos, G. Schütz und P. Feigelson
Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 4635 (1974)

67. G. Marbaix, G. Hues, A. Burny, Y. Cleuter, E. Hubert, M. Leclercq, H. Chantrenne, H. Soreq, U. Nudel und U.Z. Littauer
Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 3065 (1975)

68. G. Huez, G. Marbaix, E. Hubert, Y. Cleuter, M. Leclercq, H. Chantrenne, R. Devos, H. Soreq, U. Nudel und U.Z. Littauer
Eur. J. Biochem. 59, 589 (1975)

69. U. Nudel, H. Soreq, U.Z. Littauer, G. Marbaix, G. Huez, M. Leclercq, E. Hubert und H. Chantrenne
Eur. J. Biochem. 64, 115 (1976)

70. C. Milcarek, R. Price und S. Penman
Cell 3, 1 (1974)

71. L.F. Johnson, H.T. Abelson, H. Green und S. Penman
Cell 1, 95 (1974)

Lebenslauf

16.5.1948	geboren in Santiago de Chile als Sohn des Rechtsanwaltes Manuel Grez und seiner Ehefrau Paulina geb. Saavedra
1954-1966	Besuch der Colegio del Verbo Divino in Santiago
November 1966	Reifeprüfung
1967-1971	Chemie-Studium an der Universidad Catolica in Santiago
1971-1972	Diplomarbeit am Institut für Biophysik der Universidad de Chile
Juni 1972	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
1972-1973	wissenschaftliche Arbeit am Institut für Biochemie der Universidad de Chile
1.12.1973-30.3.1974	Besuch des Goethe-Institutes in Blaubeuren
1.4.1974-30.3.1975	Arbeit an einem Forschungsprojekt am Institut für Strahlentechnologie des Kernforschungszentrums in Karlsruhe
1.4.1975	Beginn der vorliegenden Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Niessing